

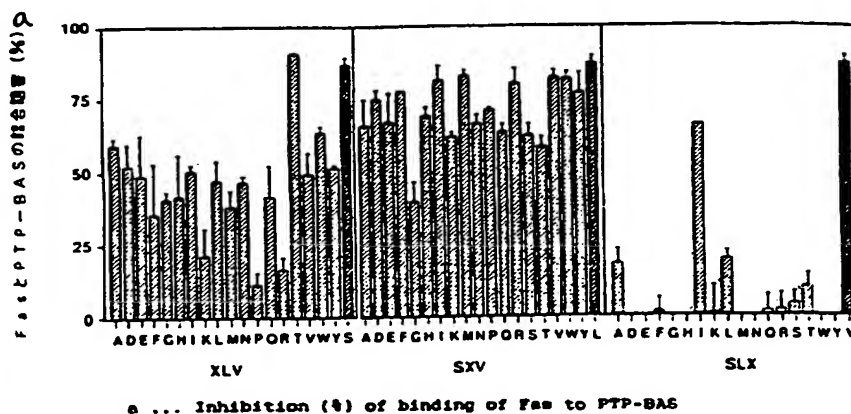


(51) 国際特許分類6 C07K 5/062, 14/705, 14/715, A61K 38/03, 38/06, 38/17, G01N 33/68	A1	(11) 国際公開番号 WO97/11091 (43) 国際公開日 1997年3月27日 (27.03.97)
(21) 国際出願番号 PCT/JP96/02697 (22) 国際出願日 1996年9月19日 (19.09.96) (30) 優先権データ 特願平7/240301 1995年9月19日 (19.09.95) 特願平7/352038 1995年12月27日 (27.12.95) 特願平8/210528 1996年7月22日 (22.07.96) (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 麒麟麦酒株式会社 (KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒104 東京都中央区新川二丁目10番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 片岡之郎(KATAOKA, Shiro)[JP/JP] 西島羽剛(NISHITOBA, Tsuyoshi)[JP/JP] 高橋基夫(TAKAHASHI, Motoo)[JP/JP] 澤 英治(SAWA, Eiji)[JP/JP] 上正原勝(KAMISHOHARA, Masaru)[JP/JP] 〒370-12 群馬県高崎市宮原町3番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所内 Gunma, (JP)	(74) 代理人 弁理士 佐藤一雄, 外(SATO, Kazuo et al.) 〒100 東京都千代田区丸の内三丁目2番3号 富士ビル323号 協和特許法律事務所 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO特許 (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). 添付公開書類 国際調査報告書	

(54) Title: **NOVEL PEPTIDE COMPOUNDS AND MEDICINAL COMPOSITIONS THEREOF**

(54) 発明の名称 **新規ペプチド化合物およびその医薬組成物**

Applicant: Taka-Aki Sato
 U.S. Serial No.: 10/092,138
 Filed: March 6, 2002
 Exhibit 7



(57) Abstract

Novel peptides having the activity of regulating the function of a cell membrane receptor which carries an intracellular carboxy-terminal amino acid sequence of -A₁-A₂-A₃, carrying an amino acid sequence consisting of at least three amino acids in the lengthwise direction, and having a carboxy-terminal sequence of -X-Y-Z (wherein X is the same as A₁, Y represents an amino acid belonging to the same category as A₁ does; Z is the same as A₃ does); derivatives thereof improved in the biological stability, cell membrane permeability or the above-mentioned regulating activity of the same and pharmaceutically acceptable salts thereof; medicinal compositions containing these compounds; a method for analyzing the function of a receptor at the C-terminus thereof by using these compounds; a method for regulating the signal transmission by a cell membrane receptor; and a method for treating diseases in association with the signal transmission by cell membrane receptors.

本発明は、細胞内カルボキシ末端のアミノ酸配列が $-A_1-A_2-A_3$ である細胞膜レセプターの機能を調節する活性を有する、少なくとも3個のアミノ酸配列を長さ方向に有し、 $-X-Y-Z$ （式中、 $X=A_1$ もしくは A_1 と同一分類に属するアミノ酸； $Y=L$ -アミノ酸あるいはグリシン； $Z=A_3$ もしくは A_3 と同一分類に属するアミノ酸）のカルボキシ末端配列を有する新規ペプチド、その生物学的安定性、細胞膜透過性、あるいは上記調節活性が向上された該ペプチドの誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩、並びにこれら化合物を含有する医薬組成物、またこれら化合物を用いてレセプターあるいはレセプターのC末端の機能を解析する方法、更にまた、細胞膜レセプターのシグナル伝達を調節する方法、並びに細胞膜レセプターのシグナル伝達にかかわる疾病の治療方法に関する。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	EE	エストニア	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	ES	スペイン	LS	レソト	RD	ロンドン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
AU	オーストラリア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SC	スロベニア
AZ	アゼルバイジャン	GB	ガブリリス	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア共和国
BB	バルバドス	GE	グルジア	MC	モナコ	SK	スロバキア
BE	ベルギー	GH	ガーナ	MD	モルドバ	SN	セネガル
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MK	マケドニア	TD	チャド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	UA	ウクライナ	TG	トーゴ
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	ML	マリ	TJ	タジキスタン
CA	カナダ	IS	アイスランド	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MR	モーリタニア	TR	トルコ
CG	コンゴ	JP	日本	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	KE	ケニア	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CI	コート・ジボワール	KG	キルギスタン	NL	ネーデルラント	US	米国
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェコ共和国	KR	大韓民国	NZ	ニュージーランド	VN	ベトナム
DE	ドイツ	LK	スリランカ	PT	ポルトガル	YU	ユーゴスラビア

明 細 書

新規ペプチド化合物およびその医薬組成物

技 術 分 野

本発明は細胞膜レセプターの細胞内カルボキシ末端配列をもとにデザインされた、該細胞膜レセプターの機能を調節する活性を有する新規ペプチド化合物に関する。さらに本発明は、該本発明化合物を含有する医薬組成物に関する。

背 景 技 術

細胞膜レセプターは細胞膜上に存在し、リガンドから刺激を受けることによって細胞内にシグナルを伝達する。細胞は細胞膜レセプターからのシグナルにより増殖、増殖停止、分化、細胞死、そして新たな細胞膜レセプターやサイトカインの産生等、多様な変化を引き起こす。それらの細胞レベルでの制御が集約されて個体の恒常性は保たれている一方、細胞膜レセプターからのシグナルの異常は種々の疾病の原因となる。たとえば癌においては癌遺伝子としてクローニングされた遺伝子が細胞膜レセプターをコードしていた例が多数知られているし

(*erb-B1*, *neu*, *fms*, *flg*, *kit* 等)、実際、レセプター型チロシンキナーゼであるEGFレセプターの異常発現が、癌細胞の異常な増殖性の一因となっているケースが報告されている (Shcmike、Cell 37巻、705-713ページ、1984年; Zou他、Cancer Res. 47巻、6123-6125ページ、1987年)。種々のアレルギー疾患においてはIL-4やIL-5などのサイトカインの産生亢進、すなわち、IL-4レセプター、IL-5レセプターからのシグナルの増強が原因となり得ると考えられている (Meddleton他 (編) Allergy Principles and Practice、第4版、第10章、Kay他、206-211ページ、1993年)。また、血液疾患、腎疾患、循環器疾患、骨疾患、脳・神経疾

患のなかにも細胞膜レセプターからのシグナルの異常に起因するものが存在する。したがって細胞膜レセプターからのシグナルを制御できる薬剤は細胞の反応異常により引き起こされる種々の疾病の治療に応用され得る。

遺伝子クローニング技術の進歩により多くの細胞膜レセプターがクローニングされ、その発現が種々の疾患と関係があることを示唆する知見が蓄積されつつある。しかし、癌に関与するレセプター型チロシンキナーゼや、種々の病態に関与すると思われるGプロテインカップルドレセプター（GPCR）の中にはまだリガンドすら知られていないオーファンレセプターが多数存在する。また、リガンドだけでなくほとんどの細胞膜レセプターの細胞内シグナル伝達経路はまだ明らかとなっておらず、細胞膜レセプターの細胞内シグナル伝達をターゲットとした創薬研究は大きなポテンシャルを秘めながらもまだ始まったばかりといえる。現時点までの細胞内シグナル伝達をターゲットとした創薬研究の成果として蛋白質リン酸化酵素の阻害剤、蛋白質のファルネシル化酵素の阻害剤が見出されつつある（Fry他、Science 265巻、1093-1095ページ、1994年；Gibbs他、Cell 77巻、175-178ページ、1994年）。また、最近、蛋白と蛋白の結合に関するドメイン（SH-2ドメイン、ロイジンジッパー等）に注目し、その結合阻害に関する研究も精力的に行われている（Pawson他、Curr. Biol. 3巻、434-442ページ、1993年；Huber他、Curr. Med. Chem. 1巻、13-34ページ、1994年）。

レセプターの細胞内領域に蛋白が結合し、レセプターからのシグナル伝達に影響を与えるといった報告は多数あるが、厳密な意味でのレセプターのC末端（ここでは単にC末付近の配列という意味ではなく厳密にレセプターの最末端の配列を含む領域）が他の蛋白との結合に関与している例は殆ど知られていない。Fasにおいては、結合蛋白であるPTP-BASがそのシグナル伝達に与える影響が明らかにされ、C末付近の15アミノ酸領域が細胞死の調節に関わっているこ

とが指摘されているが、厳密にC末端のアミノ酸を含む領域であるかは調べられていない (Sato他、Science 268巻、411-415ページ、1995年)。

Kornau等のグループがNMDAレセプターとPSD-95が結合することを見出し、その結合にはNMDAレセプターのC末端の7アミノ酸残基が重要であることを報告した (Kornau他、Science 269巻、1737-1740ページ、1995年)。報文中、数種のNMDAレセプターのC末端に共通している配列をtSXVモチーフと名付け、他の類似の配列を有するレセプターについても公表した。Kim等のグループはShaker型のKチャンネルのC末端にもPSD-95が結合することを報告した (Kim他、Nature 378巻、85-88ページ、1995年)。これらの研究はFasとPTP-BASの結合以外にもレセプターのC末端を介した結合が存在することを示している。しかし、これらの研究ではその結合がシグナル伝達に及ぼす影響については何ら示してはいない。また、結合の生理的な役割や結合を阻害したときの細胞レベルあるいは組織レベルでの変化についても何ら示していない。したがって、レセプターのtSXVモチーフを介した結合の重要性はまだ十分に知られていない。また、tSXVモチーフ以外にもレセプターC末端の結合に関与するモチーフがあることは現在のところ知られていない。このように、レセプターのC末端がそのレセプターの機能に影響を与えることを示唆する知見は蓄積されつつあるが、まだ、明確にそれは証明されるに至っていない。後述において本発明における例として示したVIPレセプター、 β_2 -アドレナジックレセプターあるいはIL-8レセプターに関しては、これらのレセプターのC末端がその機能調節に関与していることなどは全く知られていないのが現状である。

本発明は、細胞膜レセプターC末端の細胞内シグナル調節に関与する領域 (Receptor C-terminal Regulatory Region の頭文字を取りRCR領域という) の配列をもとにデザインした

新規化合物、該化合物を含む医薬組成物及び該化合物を用いてレセプターの機能を解析する方法に関するが、細胞膜レセプターのR C R領域の機能を調節する活性を有する化合物をそのレセプターC末端配列情報に基づきデザインした化合物自体、また、該化合物を用いてレセプターの機能を解析する方法などに関しては本発明者らの知る限りにおいて全く知られていないのが現状である。

上記したように本発明はレセプターのC末端の機能を解析する方法にも関するが、当分野の従来の技術は、レセプターのC末端に欠失あるいは置換を導入しその変異レセプターの遺伝子を細胞に導入するという方法が一般的であった。本発明で示したように、レセプターのC末端からデザインした化合物を用い、遺伝子操作技術を用いず、レセプターのC末端の機能を解析する方法は全く知られていない。

本発明は、また、細胞膜レセプターC末端とその結合蛋白との結合を阻害することにより細胞膜レセプターのシグナルを調節する方法にも関する。この方法においては阻害剤として本発明の化合物が効果的に用いうる。なお、細胞膜レセプターC末端とその結合蛋白との結合を阻害することにより、細胞膜レセプターのシグナルを調節する方法自体、本発明者らの知る限りにおいて全く知られていないのが現状である。

後述において本発明における例として用いた個々のレセプターに関する従来の知見について以下説明する。

F a s

F a sは細胞表面上に存在するレセプターであり、TNFレセプタースーパーファミリーに属する(Smith 他、Cell 76巻、959-962ページ、1994年) F a sはその細胞外領域にF a sリガンドもしくは抗F a s抗体が結合したとき細胞内に細胞死のシグナルを伝え細胞にアポトーシスを誘導する機能をもつことが知られている(Itoh他、Cell 66巻、233-243ページ、1994年)

91年; Suda他、Cell 75巻、1169-1178ページ、1993年)。
Fasリガンドは細胞障害性T細胞に発現しており、標的細胞を攻撃する際に、Fasを介した系を使用することが知られている (Lowin 等、Nature 370巻、650-652ページ、1994年)。Fasを発現する組織は広範に渡りFasを介した細胞死の系が幅広い組織で生理的意義を有することが示唆されている。

これまでに、Fasに対する抗体等の刺激で癌細胞にアポトーシスを誘導する技術は知られている。インビボにおけるFasを介した細胞死の癌細胞に対する効果としては、B細胞リンパ腫を移植したヌードマウスに抗Fas抗体を投与し、B細胞リンパ腫を退縮させたことが報告されている (Trauth他、Science 245巻、301-305ページ、1989年)。

Fasを有している細胞がかならずしもFasリガンドや抗Fas抗体で細胞死を誘導するわけではなく、Fasを発現しているにもかかわらずアポトーシスが誘導されない癌細胞も多数報告されており、それらの癌細胞に対してはFasに対する抗体等の刺激は無効である (Wong他、J. Immunol. 152巻、1751-1755ページ、1994年)。FasのC末端の15アミノ酸残基を欠失した変異型のFasは正常型Fasより細胞死を伝える能力が増強されておりFasのC末端の15アミノ酸残基はFasを介した細胞死の調節領域であることが知られている (Itoh他、J. Biol. Chem. 268巻、10932-10937ページ、1993年)。また、PTP-BASが細胞内でFasのC末端の15アミノ酸を含む領域に結合しFasを介した細胞死シグナルを負に調節することが報告されている (Sato他、上述)。PTP-BASはチロシン脱リン酸化酵素として発見された (Maekawa 他、FEBS Lett. 337巻、200-206ページ、1994年)。PTP-BASは、発見者の違いでhPTP1E、PTPL1とも呼ばれている (Banville他、J. Biol. Chem. 269巻、22320-22327ページ、

1994年; Saras 他、J. Biol. Chem. 269巻、24082-24089ページ、1994年)。

PTP-BASの発現はヒト成人の腎臓、肺に最も強く認められ、脳、心臓、脾臓、胎盤等においても発現している。しかし、大腸、末梢血、肝、骨格筋には殆ど発現が認められていない (Maekawa 他、上述; Banville他、上述; Saras 他、上述)。これら各組織における発現の意義は明らかではない。

PTP-BASを標的とした化合物を用いて癌細胞を殺す方法は、本発明者らの知る限りにおいてこれまで知られていない。また、FasとPTP-BASとの相互作用には、FasのC末付近の15アミノ酸配列が重要との報告がなされているが (Sato他、上述; Cleveland 他、Cell 81巻、479-482ページ、1995年)、それらの相互作用を阻害する化合物は、本発明者らの知る限りにおいてこれまで知られていない。

VIPレセプター

Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) は28アミノ酸よりなるニューロペプチドであり、Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide (PACAP)、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、パラサイロイドホルモンらとともにファミリーを形成している。VIPは平滑筋を弛緩させ血流を増加させる機能を有する。また、肺、腸の上皮からの水やイオンの流れ、ニューロンの増殖や生存を調節し、多くの免疫機能にも影響を与える。

VIPに選択的な高親和性レセプターは神経系、呼吸器系、胃腸系、免疫系のあるサブセットの細胞に発現している。ヒト高親和性タイプ1VIPレセプター (HVR1) 遺伝子はひと大腸癌細胞HT-29からクローニングされ、その染色体遺伝子も取得されている (Couvaineau 他、Biochem. Biophys. Res. Commun. 193巻、546-553ページ、

1993年; Sreedharan他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92巻、2939-2943ページ、1995年)。HVR1はGPCRファミリーに属し、7回膜貫通構造を有する。HVR1の発現はヒトの肺に最も強く認められ、前立腺、末梢血細胞、肝、脳、小腸等においても発現している(Sreedharan他、上述)。VIPのアンタゴニストが非小細胞肺癌の増殖を抑制したこと(Moody他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90巻、4345-4349ページ、1993年)、HVR1遺伝子が小細胞肺癌に関与しているヒト染色体3番の短腕に存在していること(Sreedharan他、上述)からHVR1と肺癌との関係が注目される。

VIPレセプターのシグナル伝達機構についてはG蛋白を通してアデニル酸シクラーゼ活性を刺激することが知られている(Couvineau他、J. Biol. Chem. 261巻、14482-14489ページ、1986年; Laburthe他、Ann. N. Y. Acad. Sci. 527巻、296-313ページ、1988年)。しかし、VIPレセプターの細胞内C末端領域がその機能に影響を及ぼすことは、本発明者らの知る限りにおいてこれまで知られていない。また、VIPレセプターの細胞内シグナル伝達系に選択的に作用する薬剤は本発明者らの知る限りにおいてこれまで知られていない。

β_2 -アドレナジックレセプター

アドレナジックレセプターは従来、主として薬理学的基準により α_1 、 α_2 及び β_1 、 β_2 受容体サブタイプに分類されてきた。 β -アドレナジックレセプターはサブタイプにより発現する組織およびその生理的役割が異なり β_1 は心臓、脂肪組織、大脳皮質に存在し、その活性化は心拍増加、心収縮力増加、脂肪分解を誘導する。 β_2 は肺、肝臓、小脳、平滑筋、骨格筋、多核白血球に存在し、気管支筋や脈管平滑筋の弛緩を引き起こす。それぞれのレセプターの生理的機能が異なるのでそれぞれに特異的な阻害剤が求められているが、既存の β -アドレナ

ジックレセプター阻害剤は選択性が低い。特に β_2 -アドレナジックレセプターに対する特異的阻害剤はほとんどなく、ある程度選択的な阻害剤としてブトキサミンが知られているのみである。特異的 β_2 -アドレナジックレセプター阻害剤は β_2 -アドレナジックレセプターの異常亢進が見られる緑内障患者の治療に利用できる。既存の β_2 -アドレナジックレセプター阻害剤は選択性が低いため、心臓等 β_1 -アドレナジックレセプターが多量に発現している組織への副作用が問題となっている。したがってもうひとつの特異的 β_2 -アドレナジックレセプター阻害剤の有用性として、非選択的 β -アドレナジックレセプター阻害剤の副作用の軽減に利用できる可能性が考えられる。

β_2 -アドレナジックレセプターは1987年にクローニングされたGPCRファミリーに属するレセプターである(Kobilka他、J. Biol. Chem. 262巻、7321-7327ページ、1987年)。 β_2 -アドレナジックレセプターはG蛋白質を介してアデニル酸シクラーゼを活性化することが知られている。 β_2 -アドレナジックレセプターの細胞内C末領域付近は同種脱感作に関係があることが報告されている。 β_2 -アドレナジックレセプターの細胞内シグナル伝達系に選択的に作用する薬剤は本発明者らの知る限りにおいてこれまで知られていない。

IL-8レセプター

インターロイキン-8 (IL-8) は分子量8 kDaの72アミノ酸からなるペプチドであり、インターロイキン-1及び他の刺激性サイトカインによる活性化に伴い多様な細胞型により産生される(Westwick他、Immunology Today 10巻、146ページ、1988年)。
IL-8は、好中球の走化性及び脱顆粒を促進する。IL-8はインビトロでは好中球の潜在的な化学誘因剤であり、インビボでは強力な炎症効果を有することが示されている。さらに、種々の炎症性疾患患者の患部や血液中にはIL-8の

産生が見られ、慢性関節リウマチ、痛風、好中球性皮膚炎、喘息、潰瘍性大腸炎、敗血症、成人呼吸切迫症候群、白血病などの疾患にはIL-8が関与していることが明らかにされている。このため、IL-8作用の阻害剤またはアンタゴニストが有用な抗炎症剤であることが期待される。

IL-8のレセプターはGPCRファミリーに属する分子量約60kDaの糖蛋白であり、1991年にクローニングされた(Holmes他、Science 253巻、1278-1280ページ、1991年；Murphy他、Science 253巻、1280-1283ページ、1991年)。IL-8レセプターはタイプAとタイプBが知られており、タイプAとタイプBで発現する細胞が異なる。タイプAはPHA刺激T細胞、CD4⁺T細胞、単球、滑膜細胞、好中球など広い範囲に発現している。一方、タイプBは主に好中球に発現が見られる。疾病との関わりとして、白血球浸潤を伴う好中球性皮膚炎においては、IL-8レセプターの発現が著しく増加すること(Kemeny他、Int. Arch. Allergy Immunol. 104巻、317-322ページ、1994年)、急性糸球体腎炎モデルで抗IL-8抗体の投与によりたんぱく尿を抑制し得ること等が報告されている(Wada他、J. Exp. Med. 180巻、1135-1140ページ、1994年)。

IL-8レセプターの細胞内領域にはG蛋白が結合しており、シグナル伝達に関与することが報告されている(Kupper他、Biochem. J. 282巻、429-434ページ、1992年)。しかし、IL-8レセプターの細胞内C末端領域がその機能に影響を及ぼすことは、本発明者らの知る限りにおいてこれまで知られていない。また、IL-8レセプターの細胞内シグナル伝達系に選択的に作用する薬剤は本発明者らの知る限りにおいてこれまで知られていない。

本発明は、細胞膜レセプターの細胞内カルボキシ末端配列をもとにデザインさ

れた、該細胞膜レセプターの機能を調節する活性を有する新規化合物を開発することを目的とする。また、本発明は、該新規化合物を含む新規医薬組成物を開発することを目的とする。さらに、本発明は、該新規化合物を用いて細胞膜レセプターのC末端の機能を解析する方法を提供することを目的とする。

更にまた、本発明は、細胞膜レセプターのシグナル伝達を調節する方法を提供すること、並びに細胞膜レセプターのシグナル伝達にかかわる疾病の治療方法を提供することを目的とする。

発明の開示

本発明者らは、上記の目的に即して鋭意研究を行った結果、まず、F a sのC末端配列を有するペプチド及びそれらの誘導体がF a sとPTP-BASとの結合を阻害する活性を有することを初めて見出すと共に、それらの化合物が細胞死シグナルを正に調節することを見出した。すなわち、F a sとPTP-BASとの結合を阻害するのに必須なペプチドの単位を求め、その誘導体を癌細胞に作用させたところこのものがF a sによる細胞死シグナルを増強することを見出した。次いで、本発明者らは、F a sとは全く異なるレセプターファミリーに属するVIPレセプターに関して、このレセプターのC末端配列を有するペプチド誘導体がVIPレセプターの機能を抑制することを見出した。すなわち、該ペプチド誘導体が、マグヌスの系でVIP依存的な気管支の弛緩を抑制することを見出した。さらに、本発明者らはF a s、VIPレセプターとはC末端配列の異なる β_2 -アドレナジックレセプターやIL-8レセプターに関してもそれらのC末端配列をもとにデザインされたペプチド誘導体がそれらレセプターの機能に何らかの効果を示すことを見出した。すなわち、 β_2 -アドレナジックレセプターのC末端配列をもつペプチド誘導体が、 β_2 -アドレナジックレセプターにアゴニスティックに作用するイソプロテレノールにより誘導される気管支の弛緩を抑制すること、さらにIL-8レセプターのC末端配列をもつペプチド誘導体がIL

ー 8 により誘導されるカルシウムの細胞内取り込みを選択的に抑制することを見出した。これらのことは、レセプターの属するファミリー、あるいは該レセプターの C 末端のアミノ酸残基の種類によらず、広くレセプターの C 末端領域がそのシグナル伝達に何らかの関与をしており、しかもレセプターの C 末端に関するアミノ酸配列の情報が得られるならば、それらに基づいてデザインされたペプチドあるいはその誘導体は、そのレセプターのリガンドや、細胞内シグナル伝達経路の詳細がたとえわからなくても該レセプターのシグナル伝達を制御し得ることを意味しているといえる。

上記した 4 つのレセプターは C 末端から 3 番目のアミノ酸残基がセリンまたはスレオニンであるという共通した特徴を有している。本発明者らは、さらに、該特徴を有しているレセプター群に関して GCG ソフトウェアパッケージ (ジェネティックスコンピューターグループ社製) を使用して、P I P - P r o t e i n データベースを検索し、その C 末端配列の特徴に基づいて分類し、下表の結果を得た。その特徴を有するレセプターを本発明において t S X X モチーフを有するレセプターと称す。ここで S はセリン又はスレオニンを示し、各 X は任意のアミノ酸を示す。

登録番号 - t S X Xモチーフを有するヒトレセプター

A27079 - fibronectin receptor alpha chain
 A54260 - glutamate receptor 6 kainate-preferring receptor
 A55493 - oxytocin receptor
 JC1350 - transforming growth factor beta receptor III
 OYHUCR - natriuretic peptide receptor C
 S34486 - calcitonin receptor
 S51316 - prostaglandin E receptor, subtype EP3C
 A25690 - insulin-like growth factor I receptor
 A36243 - luteinizing hormone-choriogonadotropin receptor I
 A45363 - growth hormone-releasing hormone receptor
 S37182 - ALK-2 protein
 JP0077 - protein-tyrosine kinase sky
 A53587 - prostanoid IP receptor
 S36750 - cannabinoid receptor CB2
 A23261 - nicotinic acetylcholine receptor gamma chain
 A48754 - CTLA-4 counter-receptor B7-2
 A49690 - prostaglandin E receptor, subtype EP1
 JN0605 - somatostatin receptor 4
 OYHUHX - heat-stable enterotoxin receptor
 S21052 - interleukin-5 receptor
 S26667 - G protein-coupled receptor BLR
 OYHUAR - natriuretic peptide receptor A
 A40144 - prolactin receptor long form
 A48833 - zona pellucida secondary sperm receptor ZP2
 S12050 - protein-tyrosine-phosphatase beta
 A31460 - leukocyte surface glycoprotein CD16
 A36563 - mannose receptor
 C55733 - G protein-coupled receptor GPR3
 JC2331 - adrenergic receptor alpha 1A
 JC2463 - vasoactive intestinal peptide receptor

C末端配列

KPPAT SDA
 LPGKE TMA
 SCSQP STA
 PCSSS STA
 IRSHF SVA
 IIEQE SSA
 NEIIQ TEA
 PLPQS STC
 DKTRY TEC
 AKVLT SMC
 LDKLK TDC
 GLLPH SSC
 ASVAC SLC
 RDLDL SDC
 RPYLP SPD
 CDKSD TCF
 RHSGI SHF
 PLTRT TTF
 TDRES TYF
 ETLED SVF
 NATSL TTF
 ERGSS TRG
 ACFTH SFH
 EKRTV SNH
 RDPVY SRH
 YFSVK TNI
 EQNEH SVI
 PATYN SMI
 SNLRE TDI
 LQTET SVI

RWHUT4 - T-cell surface glycoprotein CD4	FQKTC	SPI
S54875 - antigen CD97	LRASE	SGI
A42086 - nerve growth factor receptor homolog	LPTAA	SGK
A42100 - TGF-beta type II receptor	DGSLN	TTK
A48933 - gamma-aminobutyric acid receptor alpha5 subunit	IKGAA	SPK
JC2016 - cell adhesion receptor CD36	ACRSK	TIK
RWHU1C - cell surface glycoprotein CD11c	TPSPP	SEK
S10505 - nicotinic acetylcholine receptor beta-2 chain	DHSAP	SSK
A53611 - interleukin-8 receptor B	SGHTS	TTL
PFHUGB - platelet-derived growth factor receptor beta	AEAED	SFL
A41795 - somatostatin receptor 1	CTSRI	TTL
S32501 - somatostatin receptor SSTR3	STMRI	SYL
JH0329 - G-CSF receptor D7	LFPIT	SVL
S25852 - glutamate receptor GluR1	MPLGA	TGL
JC2131 - metabotropic glutamate receptor 5 B	YTQSS	SSL
JC2132 - metabotropic glutamate receptor 5 A	YTQSS	SSL
QRHUB2 - beta-2-adrenergic receptor	CSTND	SLL
A33786 - thyrotropin receptor	EEVMQ	TVL
JQ1486 - activin receptor II	FPPKE	SSL
S00478 - surface glycoprotein CDw32	RKKRI	SGL
B53506 - folate receptor type gamma	HFIQD	SCL
A49191 - parathyroid hormone related peptide receptor	QEEWE	TVM
A45481 - endothelin receptor A subtype	SSHKD	SMN
JL0118 - IgG Fc receptor IIa	NDHVN	SNN
RWHUC2 - T-cell surface glycoprotein CD2	NSLSP	SSN
A30586 - B-cell surface antigen CD20	PIEND	SSP
A41266 - fibroblast growth factor receptor 1	AWLTV	TRP
JQ1618 - thyrotropin receptor vl. 3	KAPSS	STP
A55733 - G protein-coupled receptor GPR1	LCLLE	TAQ
A56395 - secretory phospholipase A2 receptor	SDLEK	SDQ
JQ1488 - bradykinin B2 receptor	QOWAG	SRQ
JH0449 - histamine H2 receptor	APQGA	TDR
S10127 - muscarinic acetylcholine receptor M3	YRNIG	TAR
A35300 - G protein-coupled receptor edg-1	SGNVN	SSS

A35648 - B-cell receptor CD22	MRGFI	TQS
JN0708 - thyrotropin-releasing hormone receptor	SEVSF	SQS
JN0807 - glucagon-like peptide-1 receptor	ATCQA	SCS
JQ1042 - endothelin receptor B	SSNKY	SSS
S24356 - antidiuretic hormone receptor	SLAKD	TSS
A38142 - APO-1 antigen, Fas antigen	RNEIQ	SLV
A47253 - epidermal growth factor receptor, HER4	YRHRN	TVV
GQHUN - nerve growth factor receptor, low affinity	ESTAT	SPV
TVHUAS - transforming protein mas	TVTVE	TVV
JN0604 - VIP receptor	FQAEV	SLV
A46151 - protein-tyrosine-phosphatase zeta	AESLE	SLV
S12051 - protein-tyrosine-phosphatase gamma	AESME	SLV
A43956 - serotonin receptor 5HT-2	VNEKV	SCV
JS0616 - serotonin receptor 5HT-1C	VSERI	SSV
S48736 - serotonin 5-HT2B receptor protein	TEEQV	SYV
A47551 - NMDA receptor chain 1	DPSYS	TVV
S47555 - NMDA receptor modulatory chain hNR2A	FQAEV	SLV
A55689 - G-protein-coupled receptor 3	RSRSP	SDV
S39534 - corticotropin-releasing hormone receptor	SIKQS	TAV
QRHUB1 - beta-1-adrenergic receptor	GFASE	SKV
S39495 - u-plasminogen activator receptor form 2	EEAQA	THV
A37223 - alpha-2B-adrenergic receptor	RPWTQ	TAW
A47111 - melanocortin receptor 4	LCOLS	SRY
S29506 - neurotensin receptor	NATRE	TLY

上記表中には含まれていないが、IgE FcεRI-γのようにC末が翻訳後修飾により変化し、tSXXモチーフを持つようになるものも存在する。

細胞膜レセプターのRCR領域において、C末端より3番目のアミノ酸がセリンあるいはスレオニンである一連の配列を、本発明において上記のようにtSXXモチーフと称すが、それらの中で、例えばC末端のアミノ酸がバリンであるものについてはtSXVモチーフ、またロイシンであるものについてはtSXLモチーフと称す。以下、C末端のアミノ酸により同様に呼称する。

以上、これら複数の新規知見を基に本発明者らは本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、細胞内カルボキシル末端のアミノ酸配列が $-A_1-A_2-A_3$ である細胞膜レセプターの機能を調節する活性を有する、少なくとも3個のアミノ酸配列を長さ方向に有し、 $-X-Y-Z$ （式中、 $X=A_1$ もしくは A_1 と同一分類に属するアミノ酸； $Y=L$ -アミノ酸あるいはグリシン； $Z=A_3$ もしくは A_3 と同一分類に属するアミノ酸）のカルボキシル末端配列を有するペプチド、その生物学的安定性、細胞膜透過性、あるいは上記調節活性が向上された該ペプチドの誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩を提供するものである。

また、本発明はこれらの化合物を含有する医薬組成物を提供するものである

更にまた、本発明はこれら化合物を用いて細胞膜レセプターのC末端の機能を解析する方法を提供するものである。

また更に、本発明は細胞膜レセプターC末端とその結合蛋白との結合を阻害することにより細胞膜レセプターのシグナルを調節する方法、及び、細胞膜レセプターのシグナル伝達にかかわる疾病の治療方法をも提供するものである。

本発明の化合物はそれぞれの対応する細胞膜レセプターとは全く異なる分子であり、対応するレセプターのC末端と競合することにより該レセプターからのシグナルを調節する活性を有する化合物である。ここにおいて、「レセプターからのシグナルを調節する活性を有する」とは「レセプターからのシグナルを阻害もしくは増強する活性を有する」ということを意味する。またここでいう「阻害」とはいかなる程度での阻害をも意味し、必ずしも完全なる阻害に限定されるもの

ではない。

図面の簡単な説明

図1は、FasのC末端15アミノ酸ペプチドによるインビトロのFas／PTP-BAS結合阻害を示すオートラジオグラムである。

図2は、インビトロのFas／PTP-BASの結合におよぼす長さの異なるFasのC末端ペプチドの影響を示すグラフである。

図3は、Ac-SLVの各アミノ酸を他のL-アミノ酸あるいはグリシンに置き換え、スキャンしたペプチド1mM存在下におけるインビトロのFas／PTP-BAS結合阻害を示すグラフである。

図4は、Ac-SLVのLを他のL-アミノ酸あるいはグリシンに置き換え、スキャンしたペプチド0.1mMの存在下におけるインビトロのFas／PTP-BAS結合阻害を示すグラフである。

図5は、Ac-SLVとAc-TLVのインビトロFas／PTP-BAS結合阻害の濃度依存性曲線を示すグラフである。

図6は、D体、Nメチル体、還元体ペプチドのインビトロFas／PTP-BAS結合阻害活性を示すグラフである。

図7は、N末端修飾体のインビトロFas／PTP-BAS結合阻害の濃度依存性曲線を示すグラフである。

図8は、C末端修飾体のインビトロFas／PTP-BAS結合阻害活性を示すグラフである。

図9は、マイクロインジェクションによりヒト大腸癌DLD-1細胞内に注入されたAc-SLVの細胞死誘導作用を示す生物の形態の写真である。矢印は典型的なアポトーシス像を示す。

図10は、Cyh-NHCO-SLV-OMe、Cyh-NHCO-SLV-OEt、Ph-NHCO-SLV-OMe、Ph-NHCO-SLV-OEtの

ヒト大腸癌細胞DLD-1に対する細胞死誘導作用を示すグラフである。

図11は、Ph-NHCO-SLV-OEtのヒト大腸癌細胞DLD-1に対する細胞死誘導作用を示す生物の形態の写真である。

図12は、VIP依存的気管支の弛緩に対するPh-NHCO-SLV-OEtの作用を示すグラフである。

図13は、VIP依存的気管支の弛緩に対するPh-NHCO-SLA-OEtの作用を示すグラフである。

図14は、VIP依存的気管支の弛緩に対するPh-NHCO-SLL-OEtの作用を示すグラフである。

図15は、VIP依存的気管支の弛緩に対するPh-NHCO-SLV-OHの作用を示すグラフである。

図16は、ISO依存的気管支の弛緩に対するPh-NHCO-SLL-OEtの作用を示すグラフである。

図17は、ISO依存的気管支の弛緩に対するPh-NHCO-SLA-OEtの作用を示すグラフである。

図18は、ISO依存的気管支の弛緩に対するPh-NHCO-SLV-OEtの作用を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

I. 本発明の化合物

本発明の化合物は、C末端領域にシグナル調節領域(RCR領域)を有する細胞膜レセプターのC末端配列を基にデザインされており、レセプターのC末端に競合することにより、レセプターからのシグナルを調節する活性を有するペプチド、そのペプチド誘導体およびそれらの塩である。なお、本発明によるペプチド、そのペプチド誘導体およびそれらの塩は水和物となってもよい。より詳しくは、本発明の化合物は、レセプターC末端結合蛋白への結合活性を有するか、ま

たは、レセプターC末端結合蛋白が未知の場合も含めて、細胞内カルボキシ末端のアミノ酸配列が $-A_1-A_2-A_3$ である細胞膜レセプターの機能を調節する活性を有する、少なくとも3個のアミノ酸配列を長さ方向に有し、 $-X-Y-Z$ (式中、 $X=A_1$ もしくは A_1 と同一分類に属するアミノ酸； $Y=L$ -アミノ酸あるいはグリシン； $Z=A_3$ もしくは A_3 と同一分類に属するアミノ酸) のカルボキシ末端配列を有する化合物である。

この様な、本発明の化合物としては、具体的には、例えば、C末端配列が $-S-L-V$ であるFasとPTP-BASとの結合を阻害する、少なくとも3個のアミノ酸を長さ方向に有し、 $-X-Y-Z$ (式中、 $X=L$ -セリン、 L -スレオニン、あるいは L -システイン； $Y=L$ -アミノ酸あるいはグリシン； $Z=L$ -バリン、あるいは L -イソロイシン) のカルボキシ末端配列を有するペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩をあげることができる。

さらに、レセプターC末端結合蛋白が未知の場合の例として、C末端配列が $-S-L-V$ であるVIPレセプターの機能を阻害する、少なくとも3個のアミノ酸を長さ方向に有し、 $-X-Y-Z$ (式中、 $X=L$ -セリン、 L -スレオニン、あるいは L -システイン； $Y=L$ -アミノ酸あるいはグリシン； $Z=L$ -バリン、あるいは L -イソロイシン) のカルボキシ末端配列を有するペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩をあげることができる。

また、レセプターC末端配列がtSXVモチーフを持たない場合の例として、C末端配列が $-S-L-L$ である β_2 -アドレナジックレセプターのシグナル伝達能を阻害する、少なくとも3個のアミノ酸を長さ方向に有し、 $-X-Y-Z$ (式中、 $X=L$ -セリン、 L -スレオニン、あるいは L -システイン； $Y=L$ -アミノ酸あるいはグリシン； $Z=L$ -ロイシン) のカルボキシ末端配列を有するペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩をあげることができる。

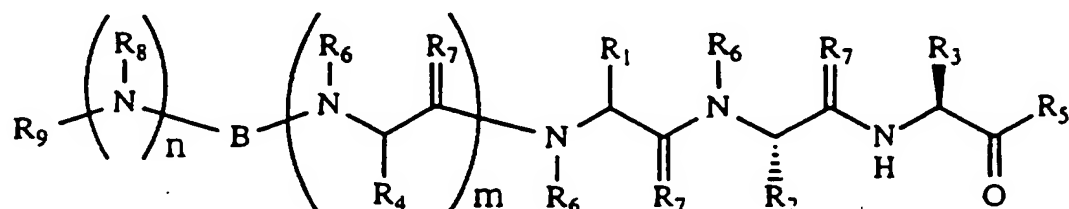
他に、レセプターC末端配列が-T-T-LであるIL-8レセプターのシグナル伝達を阻害する、少なくとも3個のアミノ酸を長さ方向に有し、-X-Y-Z（式中、X=L-セリン、L-スレオニン、あるいはL-システイン；Y=L-アミノ酸あるいはグリシン；Z=L-ロイシン）のカルボキシ末端配列を有するペプチド、それらの誘導体、および、その薬学的に容認される塩も例としてあげることができる。

本発明の化合物において、細胞膜レセプターの機能を調節する活性の観点から、長さ方向に3から8個のアミノ酸を有するものが好ましいといえる。このような細胞膜レセプターC末端機能調節剤の具体的な例として、Fas/PTP-BAS結合阻害剤に関しては、ペプチドが長さ方向に6個以上あれば15個のペプチドと同程度の活性を有し、長さ方向に3個あれば4個及び5個と同程度の活性を有することが確認されている。一般的に、ペプチド鎖長が短くなるほど生物学的組織内へのペプチドの取り込みが容易となり、その結果取り込み数が増えるようになるため、活性発現以前にペプチドが破壊されたり、生物学的に無効になる見込みが少なくなることから、本発明化合物のペプチド鎖長は3であることが好ましい。

本発明化合物において、細胞膜レセプターC末端機能調節剤のペプチド配列-X-Y-Zで、Y=D-アミノ酸の場合は殆ど機能調節活性を有さず、Y=L-アミノ酸あるいはグリシンであることが好ましい（ただし、そのアミノ酸残基の種類によってあまり該活性は左右されない。例えば、Fas/PTP-BAS結合阻害剤においては、Y=D-ロイシンでは全く活性がないが、Y=全てのL-アミノ酸およびグリシンでは高い活性を有する）。

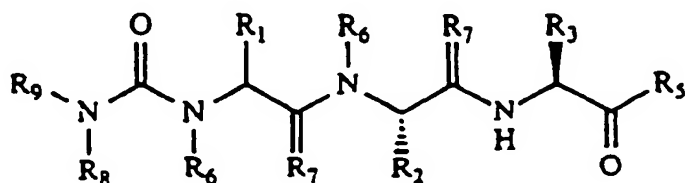
また、本発明は、細胞内で代謝的に安定で（即ち、優れた生物学的安定性を有し）、より優れたレセプターシグナル調節活性を有するペプチド誘導体に関する。本発明者らは、Fas/PTP-BAS結合阻害活性を有するペプチドの薬理学

的性質の向上を目指し、種々誘導体を合成してみたところ、驚くべきことに、N末端のアミノ基を疎水性基で修飾した化合物に、疎水性の向上に加え、上記活性の著しい増強が認められることを見出した。このような化合物としては下式4：



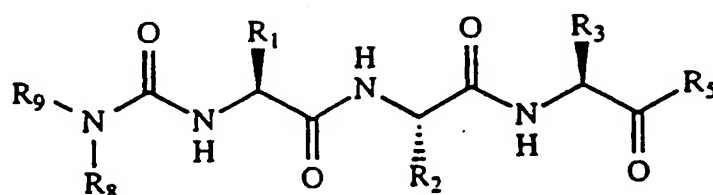
[式中、 $R_1 = A_1$ もしくは A_1 と同一分類に属するアミノ酸の側鎖構造； $R_2 = L$ -アミノ酸の側鎖構造あるいは水素； $R_3 = A_3$ もしくは A_3 と同一分類に属するアミノ酸の側鎖構造を意味し、 R_4 は任意のアミノ酸の側鎖構造であり、 R_5 は置換あるいは非置換である C_1 乃至 C_6 の直鎖、分鎖、または環状のアルコキシ基であるか、または水酸基であり、各 R_6 は個々に水素あるいはメチル基であり、各 R_7 は個々に水素あるいは酸素であり、 B はカルボニル基あるいは直接結合であり、 R_8 および R_9 はそれぞれ水素、あるいは置換もしくは非置換アルキル基、または置換もしくは非置換芳香族基であり、この場合アルキル基は直鎖、分鎖、または環状であり、 m は0乃至12であり、 n は0あるいは1であり、さらに n が1の場合は R_8 と R_9 は一緒になって環を形成してもよい；ただし、 R_6 および R_9 は同時に水素ではない] で表されるものがあげられる。

好ましいものとしては、下式5：



[式中、 R_1 = L-セリンもしくはL-スレオニンの側鎖構造； R_2 = L-アミノ酸の側鎖構造あるいは水素； R_3 = L-アミノ酸の側鎖構造あるいは水素を意味し、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 および R_9 は前述と同義である；ただし、 R_1 がセリンの側鎖であり、かつ R_2 がメチオニンの側鎖であり、かつ R_3 がグルタミンの側鎖である場合を除く] で表されるものをあげることができる。

さらに好ましいものとしては下式6：



[式中、 R_1 = L-セリンもしくはL-スレオニンの側鎖構造； R_2 = L-アミノ酸の側鎖構造あるいは水素； R_3 = L-バリン、L-イソロイシンあるいはL-ロイシンの側鎖構造を意味し、 R_5 、 R_8 および R_9 は前述と同義である] で表わされるものをあげることができる。

上記式4、式5および式6において R_8 あるいは R_9 の一方が置換もしくは非置換アルキル基または置換もしくは非置換芳香族基であるものが好ましく、この場合アルキル基は直鎖、分鎖または環状であり、上記式4においては、さらに好ましくは、 n が1でありBがカルボニル基である疎水性置換基を有するウレイドタイプの修飾基をあげることができる。これらの化合物のN末端に位置する好ましい置換基の具体例としてはアセチル基、より好ましい具体例としては、置換もしくは非置換のシクロアルキルアミノカルボニル基、置換もしくは非置換のフェニルアミノカルボニル基ならびに置換もしくは非置換の環状アミノカルボニル基をあげることができる。ただし、ここで述べるシクロアルキルおよび環状アミノは3～8員の環状構造を意味する。

一方、C末端のカルボキシル基のエステル化は疎水性の増大により、それら誘導体の生物学的組織内への取り込みを増大させることが期待される。その様な化合物としては、上記式中、 R_5 が置換あるいは非置換である C_1 乃至 C_6 の直鎖、分鎖、または環状のアルコキシ基である化合物をあげることができる。実際、Fas/PTP-BAS結合阻害剤においてC末端を修飾したペプチド誘導体は、インビトロでのFas/PTP-BAS結合阻害活性は低下するがヒトのガン細胞への作用を調べた試験において、該細胞への細胞死誘導能の著しい向上が認められた。

さらに、本発明の化合物としては、結合阻害ペプチドの生物学的組織内における安定性を目指した修飾体、例えば、D-アミノ酸による置換体、N-メチルアミノ酸による置換、あるいはアミド結合の還元体なども含まれる。具体的には、上記式中において R_6 の少なくとも一つがメチル基である化合物、もしくは、 R_1 あるいは R_4 を側鎖に有する炭素の立体配置の少なくともひとつが、S配置あるいはR配置である化合物、あるいは、 R_7 の少なくとも一つが水素である化合物をあげることができる。これらの修飾体はFasとPTP-BASとの結合を阻害する活性を有する。

これらのN末端あるいはC末端の修飾は、Fas/PTP-BAS結合阻害系においてだけでなく、他の細胞あるいは組織を用いたレセプターシグナルの調節系においても有効である。具体的な例として、VIPレセプターのシグナル伝達阻害剤や β_2 -アドレナジックレセプターのシグナル伝達阻害系において、例えば、N末をフェニルアミノカルボニル化し、C末端をエステル化している化合物が活性を示した。

また、本発明は細胞膜レセプターC末端とその結合蛋白との結合を阻害することにより細胞膜レセプターのシグナルを調節する方法、および細胞膜レセプターのシグナル伝達にかかわる疾病の治療方法にも関するものであるが、その実施の

態様として具体的には、例えば、F a s と P T P - B A S との結合を阻害することにより、癌細胞に細胞死を誘導する方法、および細胞死を誘導する化合物の化学療法的利用を挙げることができる。

後述の参考例において示したように、正常大腸組織には P T P - B A S の発現が認められないにもかかわらず、大腸癌では 8 株中 5 株に P T P - B A S の発現が認められるということが本発明者らにより初めて発見された。この事実は、ある種の癌細胞は P T P - B A S を発現することにより該細胞自体の死を回避している可能性があることを示している。本発明者らは、このような癌細胞において P T P - B A S が過剰発現しているという知見に基づき、更に鋭意研究を重ねた結果、P T P - B A S の F a s への結合を阻害することにより、P T P - B A S による癌細胞の細胞死の回避を抑制し、癌細胞に死を誘導することが可能であることを更に発見した。すなわち、本発明者らは、ある種の癌細胞において P T P - B A S の発現が正常レベルより顕著に増加していることから、本発明の F a s / P T P - B A S 結合阻害剤を添加することにより、癌細胞の抗 F a s 抗体に対する感受性を上昇させることを見出した。これらの発見は本発明の F a s / P T P - B A S 結合阻害剤が癌化学療法に有効であることを示すものである。生体中に F a s リガンドを発現している細胞傷害性 T 細胞は存在しており、従って、本発明の F a s / P T P - B A S 結合阻害剤により、細胞死シグナルの抑制を解除するだけで、癌細胞に死を誘導することが可能である。よって、本発明は、癌患者に本発明の化合物を単独で投与することからなる癌細胞に細胞死を誘導する方法を含むが、それに限定されるものではなく、本発明の化合物と共に抗 F a s 抗体や F a s リガンドとの併用による上記方法をも含むものとする。その際用いる化合物の用量を調節することにより、P T P - B A S の F a s への結合活性を低減もしくは完全に阻害することが可能である。化合物の用量を調節することによる P T P - B A S の F a s への結合活性の低減は、起こりうる好ましくない副

作用を除去するのに有効である。

このように本発明の化合物は、蛋白質脱リン酸化酵素である P T P - B A S の F a s への結合阻害剤として有効である。P T P - B A S が認識するペプチドは後述の参考例から明らかなように特異性が強く、それ故、本発明の化合物は、一般的な蛋白質脱リン酸化酵素阻害剤の場合よりも副作用が少ないであろうと推察される。

本発明において、本文中に何ら記載のない限り、以下に示すように慣用の 1 文字表記でアミノ酸を示すものとする。

アラニン (A)、アルギニン (R)、アスパラギン (N)、アスパラギン酸 (D)、システイン (C)、グルタミン (Q)、グルタミン酸 (E)、グリシン (G)、ヒスチジン (H)、イソロイシン (I)、ロイシン (L)、リジン (K)、メチオニン (M)、フェニルアラニン (F)、プロリン (P)、セリン (S)、スレオニン (T)、トリプトファン (W)、チロシン (Y)、バリン (V)。ただし、いずれかのアミノ酸あるいはアミノ酸残基を表す場合には記号 (X) を用いる。

また、本発明において、アミノ酸の分類をその α 炭素上の側鎖の疎水性、親水性、電荷、および水素結合性により以下のように定めるが、側鎖の物理・化学的性質によってひとつのアミノ酸が複数の分類に属することが可能である。すなわち、本発明における「同一分類に属するアミノ酸」は、複数の分類のアミノ酸を同時にさす場合が包含される。なお、本発明における「アミノ酸」としては、天然型のものに限定されることなく、非天然型のものも含まれる。非天然型アミノ酸としては、例えば、ホモセリン、 β -ヒドロキシバリン、O-4-ヒドロキシフェニルチロシン、 α -t-ブチルグリシン、2-アミノ酪酸、 α -シクロヘキシルグリシン、 α -フェニルグリシンをあげることができる。

疎水性アミノ酸：A、R、N、Q、E、I、L、K、M、F、P、W、Y、V

親水性アミノ酸：R、N、D、C、Q、E、H、K、S、T、Y

正電荷アミノ酸：R、H、K

負電荷アミノ酸：D、E

水素結合性アミノ酸：R、N、D、C、Q、E、H、K、M、S、T、Y

さらに、アミノ酸以外の置換基の略号については、アセチル基 (Ac)、メチル基 (Me)、エチル基 (Et)、イソプロピル基 (iPr)、フェニル基 (Ph)、シクロヘキシル基 (Cyh) をもって表す。

本発明の化合物の具体例としては以下に示すものがあげられる：

(1) tSXX

a) N末アセチル、C末フリー体：

Ac-SXA、Ac-SXC、Ac-SXD、Ac-SXE、Ac-SXF、
Ac-SXG、Ac-SXH、Ac-SXI、Ac-SXK、Ac-SXL、
Ac-SXM、Ac-SXN、Ac-SXP、Ac-SXQ、Ac-SXR、
Ac-SXS、Ac-SXT、Ac-SXV、Ac-SXW、Ac-SXY
Ac-TXA、Ac-TXC、Ac-TXD、Ac-TXE、Ac-TXF、
Ac-TXG、Ac-TXH、Ac-TXI、Ac-TXK、Ac-TXL、
Ac-TXM、Ac-TXN、Ac-TXP、Ac-TXQ、Ac-TXR、
Ac-TXS、Ac-TXT、Ac-TXV、Ac-TXW、Ac-TXY。

b) N末アセチル、C末エステル体：

Ac-SXA-OEt、Ac-SXC-OEt、Ac-SXD-OEt、Ac-SXE-OEt、Ac-SXF-OEt、Ac-SXG-OEt、Ac-SXH-OEt、Ac-SXI-OEt、Ac-SXK-OEt、Ac-SXL-OEt、Ac-SXM-OEt、Ac-SXN-OEt、Ac-SXP-OEt、Ac-SXQ-OEt、Ac-SXR-OEt、Ac-SXS-OEt、Ac-SXT-OEt、Ac-SXV-OEt、Ac-SXW-OEt、Ac-SXY

-OEt。

Ac-TXA-OEt、Ac-TXC-OEt、Ac-TXD-OEt、Ac-TXE-OEt、Ac-TXF-OEt、Ac-TXG-OEt、Ac-TXH-OEt、Ac-TXI-OEt、Ac-TXK-OEt、Ac-TXL-OEt、Ac-TXM-OEt、Ac-TXN-OEt、Ac-TXP-OEt、Ac-TXQ-OEt、Ac-TXR-OEt、Ac-TXS-OEt、Ac-TXT-OEt、Ac-TXV-OEt、Ac-TXW-OEt、Ac-TXY-OEt。

c) N末フェニルアミノカルボニル、C末フリー体：

Ph-NHCO-SXA、Ph-NHCO-SXC、Ph-NHCO-SXD、
Ph-NHCO-SXE、Ph-NHCO-SXF、Ph-NHCO-SXG、
Ph-NHCO-SXH、Ph-NHCO-SXI、Ph-NHCO-SXK、
Ph-NHCO-SXL、Ph-NHCO-SXM、Ph-NHCO-SXN、
Ph-NHCO-SXP、Ph-NHCO-SXQ、Ph-NHCO-SXR、
Ph-NHCO-SXS、Ph-NHCO-SXT、Ph-NHCO-SXV、
Ph-NHCO-SXW、Ph-NHCO-SXY。

Ph-NHCO-TXA、Ph-NHCO-TXC、Ph-NHCO-TXD、
Ph-NHCO-TXE、Ph-NHCO-TXF、Ph-NHCO-TXG、
Ph-NHCO-TXH、Ph-NHCO-TXI、Ph-NHCO-TXK、
Ph-NHCO-TXL、Ph-NHCO-TXM、Ph-NHCO-TXN、
Ph-NHCO-TXP、Ph-NHCO-TXQ、Ph-NHCO-TXR、
Ph-NHCO-TXS、Ph-NHCO-TXT、Ph-NHCO-TXV、
Ph-NHCO-TXW、Ph-NHCO-TXY。

d) N末フェニルアミノカルボニル、C末エステル体：

Ph-NHCO-SXA-OEt、Ph-NHCO-SXC-OEt、Ph-

NHCO-SXD-OEt, Ph-NHCO-SXE-OEt, Ph-NHCO-SXF-OEt, Ph-NHCO-SXG-OEt, Ph-NHCO-SXH-OEt, Ph-NHCO-SXI-OEt, Ph-NHCO-SXK-OEt, Ph-NHCO-SXL-OEt, Ph-NHCO-SXM-OEt, Ph-NHCO-SXN-OEt, Ph-NHCO-SXP-OEt, Ph-NHCO-SXQ-OEt, Ph-NHCO-SXR-OEt, Ph-NHCO-SXS-OEt, Ph-NHCO-SXT-OEt, Ph-NHCO-SXV-OEt, Ph-NHCO-SXW-OEt, Ph-NHCO-SXY-OEt.

Ph-NHCO-TXA-OEt, Ph-NHCO-TXC-OEt, Ph-NHCO-TXD-OEt, Ph-NHCO-TXE-OEt, Ph-NHCO-TXF-OEt, Ph-NHCO-TXG-OEt, Ph-NHCO-TXH-OEt, Ph-NHCO-TXI-OEt, Ph-NHCO-TXK-OEt, Ph-NHCO-TXL-OEt, Ph-NHCO-TXM-OEt, Ph-NHCO-TXN-OEt, Ph-NHCO-TXP-OEt, Ph-NHCO-TXQ-OEt, Ph-NHCO-TXR-OEt, Ph-NHCO-TXS-OEt, Ph-NHCO-TXT-OEt, Ph-NHCO-TXV-OEt, Ph-NHCO-TXW-OEt, Ph-NHCO-TXY-OEt.

e) N末シクロヘキシルアミノカルボニル体:

Cyh-NHCO-SXV, Cyh-NHCO-TXV, Cyh-NHCO-SXI, Cyh-NHCO-TXI, Cyh-NHCO-SXL, Cyh-NHCO-TXL, Cyh-NHCO-SXV-OEt, Cyh-NHCO-TXV-OEt, Cyh-NHCO-SXI-OEt, Cyh-NHCO-TXI-OEt, Cyh-NHCO-SXL-OEt, Cyh-NHCO-TXL-OEt.

(2) tSLV

a) N末フリー、C末フリー体：

RNEIQSLV、NEIQSLV、EIQSLV、IQSLV、QSLV、SLV。

b) N末アセチル、C末フリー体：

Ac-RNEIQSLV、Ac-NEIQSLV、Ac-EIQSLV、Ac-IQSLV、Ac-QSLV、Ac-SLV、Ac-CLV、Ac-TLV

c) N末アセチル、C末エステル体：

Ac-EIQSLV-OEt、Ac-IQSLV-OEt、Ac-SLV-OMe、Ac-SLV-OEt、Ac-SLV-OiPr、Ac-CLV-OMe、Ac-TLV-OMe、Ac-TLV-OEt、Ac-TLV-OiPr。

d) N末フェニルアミノカルボニル、C末フリー体：

Ph-NHCO-SLV、Ph-NHCO-CLV、Ph-NHCO-TLV。

e) N末フェニルアミノカルボニル、C末エステル体：

Ph-NHCO-SLV-OMe、Ph-NHCO-CLV-OMe、Ph-NHCO-TLV-OMe、Ph-NHCO-SLV-OEt、Ph-NHCO-CLV-OEt、Ph-NHCO-TLV-OEt、Ph-NHCO-SLV-OiPr、Ph-NHCO-CLV-OiPr、Ph-NHCO-TLV-OiPr。

f) N末シクロヘキシルアミノカルボニル、C末フリー体：

Cyh-NHCO-SLV、Cyh-NHCO-CLV、Cyh-NHCO-TLV

g) N末シクロヘキシルアミノカルボニル、C末エステル体：

Cyh-NHCO-SLV-OMe、Cyh-NHCO-CLV-OMe、

Cy h-NHCO-TLV-OMe、Cy h-NHCO-SLV-OEt、
Cy h-NHCO-CLV-OEt、Cy h-NHCO-TLV-OEt、
Cy h-NHCO-SLV-OiPr、Cy h-NHCO-CLV-OiPr、
Cy h-NHCO-TLV-OiPr。

h) N末フェニルカルボニル、C末フリー体：

Ph-CO-SLV、Ph-CO-CLV、Ph-CO-TLV。

i) N末フェニルカルボニル、C末エステル体：

Ph-CO-SLV-OMe、Ph-CO-CLV-OMe、Ph-CO-
TLV-OMe、Ph-CO-SLV-OEt、Ph-CO-CLV-OEt、
Ph-CO-TLV-OEt。

j) N末シクロヘキシルカルボニル、C末フリー体：

Cy h-CO-SLV、Cy h-CO-CLV、Cy h-CO-TLV。

k) N末シクロヘキシルカルボニル、C末エステル体：

Cy h-CO-SLV-OMe、Cy h-CO-CLV-OMe、Cy h-CO-
TLV-OMe、Cy h-CO-SLV-OEt、Cy h-CO-CLV-
OEt、Cy h-CO-TLV-OEt。

l) 還元体：

Ac-S- ϕ -(CH₂NH)-LV、Ac-SL- ϕ -(CH₂NH)-V、
Ac-S- ϕ -(CH₂NH)-LV-OMe、Ac-SL- ϕ -(CH₂NH)-
V-OMe、Ac-S- ϕ -(CH₂NH)-LV-OEt、Ac-SL- ϕ -
-(CH₂NH)-V-OEt。

m) Nメチル体：

Ac-(NMe)SLV、Ac-S-(NMe)LV、Ac-(NMe)SLV-
OMe、Ac-S-(NMe)LV-OMe。

n) D体：

Ac-(D)SLV、Ac-(D)SLV-OMe。

o) SLI誘導体：

Ac-SLI、Ac-SLI-OMe、Ac-SLI-OEt、Ac-SLI-OiPr、Ph-NHCO-SLI、Ph-NHCO-SLI-OMe、Ph-NHCO-SLI-OEt、Ph-NHCO-SLI-OiPr。

p) SLA誘導体：

Ac-SLA、Ac-SLA-OMe、Ac-SLA-OEt、Ph-NHCO-SLA、Ph-NHCO-SLA-OMe、Ph-NHCO-SLA-OEt、Ph-NHCO-SLA-OiPr。

(3) 他の tSXV

a) N末アセチル、C末フリー体：

Ac-SAV、Ac-SCV、Ac-SDV、Ac-SEV、Ac-SFV、
Ac-SGV、Ac-SHV、Ac-SIV、Ac-SKV、Ac-SMV、
Ac-SNV、Ac-SPV、Ac-SQV、Ac-SRV、Ac-SSV、
Ac-STV、Ac-SVV、Ac-SWV、Ac-SYV、Ac-TAV、
Ac-TCV、Ac-TDV、Ac-TEV、Ac-TFV、Ac-TGV、
Ac-THV、Ac-TIV、Ac-TKV、Ac-TMV、Ac-TNV、
Ac-TPV、Ac-TQV、Ac-TRV、Ac-TSV、Ac-TTV、
Ac-TVV、Ac-TWV、Ac-TYV。

b) N末アセチル、C末エステル体：

Ac-SAV-OMe、Ac-SCV-OMe、Ac-SDV-OMe、Ac-SEV-OMe、Ac-SFV-OMe、Ac-SGV-OMe、Ac-SHV-OMe、Ac-SIV-OMe、Ac-SKV-OMe、Ac-SMV-OMe、Ac-SNV-OMe、Ac-SPV-OMe、Ac-SQV-OMe、Ac-SRV-OMe、Ac-SSV-OMe、Ac-STV-OMe、Ac-

SVV-OMe、Ac-SWV-OMe、Ac-SYV-OMe、Ac-TAV-OMe、Ac-TCV-OMe、Ac-TDV-OMe、Ac-TEV-OMe、Ac-TFV-OMe、Ac-TGV-OMe、Ac-THV-OMe、Ac-TIV-OMe、Ac-TKV-OMe、Ac-TMV-OMe、Ac-TNV-OMe、Ac-TPV-OMe、Ac-TQV-OMe、Ac-TRV-OMe、Ac-TSV-OMe、Ac-TTV-OMe、Ac-TVV-OMe、Ac-TWV-OMe、Ac-TYV-OMe、Ac-SAV-OEt、Ac-SCV-OEt、Ac-SDV-OEt、Ac-SEV-OEt、Ac-SFV-OEt、Ac-SGV-OEt、Ac-SHV-OEt、Ac-SIV-OEt、Ac-SKV-OEt、Ac-SMV-OEt、Ac-SNV-OEt、Ac-SPV-OEt、Ac-SQV-OEt、Ac-SRV-OEt、Ac-SSV-OEt、Ac-STV-OEt、Ac-SVV-OEt、Ac-SWV-OEt、Ac-SYV-OEt、Ac-TAV-OEt、Ac-TCV-OEt、Ac-TDV-OEt、Ac-TEV-OEt、Ac-TFV-OEt、Ac-TGV-OEt、Ac-THV-OEt、Ac-TIV-OEt、Ac-TKV-OEt、Ac-TMV-OEt、Ac-TNV-OEt、Ac-TPV-OEt、Ac-TQV-OEt、Ac-TRV-OEt、Ac-TSV-OEt、Ac-TTV-OEt、Ac-TVV-OEt、Ac-TWV-OEt、Ac-TYV-OEt。

c) N末フェニルアミノカルボニル、C末フリー体：

Ph-NHCO-SAV、Ph-NHCO-SCV、Ph-NHCO-SDV、Ph-NHCO-SEV、Ph-NHCO-SFV、Ph-NHCO-SGV、Ph-NHCO-SHV、Ph-NHCO-SIV、Ph-NHCO-SKV、Ph-NHCO-SMV、Ph-NHCO-SNV、Ph-NHCO-SPV、Ph-NHCO-SQV、Ph-NHCO-SRV、Ph-NHCO-SSV、

Ph-NHCO-STV、Ph-NHCO-SVV、Ph-NHCO-SWV、
Ph-NHCO-SYV、Ph-NHCO-TAV、Ph-NHCO-TCV、
Ph-NHCO-TDV、Ph-NHCO-TEV、Ph-NHCO-TFV、
Ph-NHCO-TGV、Ph-NHCO-THV、Ph-NHCO-TIV、
Ph-NHCO-TKV、Ph-NHCO-TMV、Ph-NHCO-TNV、
Ph-NHCO-TPV、Ph-NHCO-TQV、Ph-NHCO-TRV、
Ph-NHCO-TSV、Ph-NHCO-TTV、Ph-NHCO-TVV、
Ph-NHCO-TWV、Ph-NHCO-TYV。

d) N末フェニルアミノカルボニル、C末エステル体：

Ph-NHCO-SAV-OEt、Ph-NHCO-SCV-OEt、Ph-
NHCO-SDV-OEt、Ph-NHCO-SEV-OEt、Ph-NHCO
-SFV-OEt、Ph-NHCO-SGV-OEt、Ph-NHCO-SHV
-OEt、Ph-NHCO-SIV-OEt、Ph-NHCO-SKV-OEt、
Ph-NHCO-SMV-OEt、Ph-NHCO-SNV-OEt、Ph-
NHCO-SPV-OEt、Ph-NHCO-SQV-OEt、Ph-NHCO
-SRV-OEt、Ph-NHCO-SSV-OEt、Ph-NHCO-STV
-OEt、Ph-NHCO-SVV-OEt、Ph-NHCO-SWV-OEt、
Ph-NHCO-SYV-OEt、Ph-NHCO-TAV-OEt、Ph-
NHCO-TCV-OEt、Ph-NHCO-TDV-OEt、Ph-NHCO
-TEV-OEt、Ph-NHCO-TFV-OEt、Ph-NHCO-TGV
-OEt、Ph-NHCO-THV-OEt、Ph-NHCO-TIV-OEt、
Ph-NHCO-TKV-OEt、Ph-NHCO-TMV-OEt、Ph-
NHCO-TNV-OEt、Ph-NHCO-TPV-OEt、Ph-NHCO
-TQV-OEt、Ph-NHCO-TRV-OEt、Ph-NHCO-TSV
-OEt、Ph-NHCO-TTV-OEt、Ph-NHCO-TVV-OEt、

Ph-NHCO-TWV-OEt, Ph-NHCO-TYV-OEt

(4) tSXL

a) N末アセチル、C末フリー体:

Ac-SCL, Ac-SFL, Ac-SGL, Ac-SHL, Ac-SLL,
Ac-SSL, Ac-SVL, Ac-SYL, Ac-TGL, Ac-TLL,
Ac-TTL, Ac-TVL。

b) N末アセチル、C末エステル体:

Ac-SCL-OEt, Ac-SFL-OEt, Ac-SGL-OEt, Ac-SHL-OEt, Ac-SLL-OEt, Ac-SSL-OEt, Ac-SVL-OEt, Ac-SYL-OEt, Ac-TGL-OEt, Ac-TLL-OEt, Ac-TTL-OEt, Ac-TVL-OEt, Ac-SLL-OMe, Ac-SLL-OiPr, Ac-TTL-OMe, Ac-TTL-OiPr

c) N末フェニルアミノカルボニル、C末フリー体:

Ph-NHCO-SCL, Ph-NHCO-SFL, Ph-NHCO-SGL,
Ph-NHCO-SHL, Ph-NHCO-SLL, Ph-NHCO-SSL,
Ph-NHCO-SVL, Ph-NHCO-SYL, Ph-NHCO-TGL,
Ph-NHCO-TLL, Ph-NHCO-TTL, Ph-NHCO-TVL。

d) N末フェニルアミノカルボニル、C末エステル体:

Ph-NHCO-SCL-OEt, Ph-NHCO-SFL-OEt, Ph-NHCO-SGL-OEt, Ph-NHCO-SHL-OEt, Ph-NHCO-SLL-OEt, Ph-NHCO-SSL-OEt, Ph-NHCO-SVL-OEt, Ph-NHCO-SYL-OEt, Ph-NHCO-TGL-OEt, Ph-NHCO-TLL-OEt, Ph-NHCO-TTL-OEt, Ph-NHCO-TVL-OEt, Ph-NHCO-SLL-OMe, Ph-NHCO-SLL-OiPr, Ph-NHCO-TTL-OMe, Ph-NHCO-

TTL-OiPr。

(5) tSXA

a) N末アセチル、C末フリー体：

Ac-SDA、Ac-SSA、Ac-STA、Ac-SVA、Ac-TEA、
Ac-TMA。

b) N末アセチル、C末エステル体：

Ac-SDA-OEt、Ac-SSA-OEt、Ac-STA-OEt、Ac-
SVA-OEt、Ac-TEA-OEt、Ac-TMA-OEt。

c) N末フェニルアミノカルボニル、C末フリー体：

Ph-NHCO-SDA、Ph-NHCO-SSA、Ph-NHCO-STA、
Ph-NHCO-SVA、Ph-NHCO-TEA、Ph-NHCO-TMA。

d) N末フェニルアミノカルボニル、C末エステル体：

Ph-NHCO-SDA-OEt、Ph-NHCO-SSA-OEt、Ph-
NHCO-STA-OEt、Ph-NHCO-SVA-OEt、Ph-NHCO-
TEA-OEt、Ph-NHCO-TMA-OEt。

(6) tSXC

a) N末アセチル、C末フリー体：

Ac-SDC、Ac-SLC、Ac-SMC、Ac-SSC、Ac-STC、
Ac-SVC、Ac-TDC、Ac-TEC、Ac-TGC。

b) N末アセチル、C末エステル体：

Ac-SDC-OEt、Ac-SLC-OEt、Ac-SMC-OEt、Ac-
SSC-OEt、Ac-STC-OEt、Ac-SVC-OEt、Ac-TDC-
OEt、Ac-TEC-OEt、Ac-TGC-OEt。

c) N末フェニルアミノカルボニル、C末フリー体：

Ph-NHCO-SDC、Ph-NHCO-SLC、Ph-NHCO-SMC、

Ph-NHCO-SSC、Ph-NHCO-STC、Ph-NHCO-SVC、
Ph-NHCO-TDC、Ph-NHCO-TEC、Ph-NHCO-TGC。

d) N末フェニルアミノカルボニル、C末エステル体:

Ph-NHCO-SDC-OEt、Ph-NHCO-SLC-OEt、Ph-
NHCO-SMC-OEt、Ph-NHCO-SSC-OEt、Ph-NHCO-
STC-OEt、Ph-NHCO-SVC-OEt、Ph-NHCO-TDC-
OEt、Ph-NHCO-TEC-OEt、Ph-NHCO-TGC-OEt

(7) tSXD

Ac-SPD、Ac-SPD-OEt、Ph-NHCO-SPD、Ph-
NHCO-SPD-OEt。

(8) tSXE

Ac-TME、Ac-TME-OEt、Ph-NHCO-TME、Ph-
NHCO-TME-OEt。

(9) tSXF

a) N末アセチル、C末フリー体:

Ac-SHF、Ac-SVF、Ac-TCF、Ac-TTF、Ac-TYF。

b) N末アセチル、C末エステル体:

Ac-SHF-OEt、Ac-SVF-OEt、Ac-TCF-OEt、Ac-
TTF-OEt、Ac-TYF-OEt。

c) N末フェニルアミノカルボニル、C末フリー体:

Ph-NHCO-SHF、Ph-NHCO-SVF、Ph-NHCO-TCF、
Ph-NHCO-TTF、Ph-NHCO-TYF。

d) N末フェニルアミノカルボニル、C末エステル体:

Ph-NHCO-SHF-OEt、Ph-NHCO-SVF-OEt、Ph-
NHCO-TCF-OEt、Ph-NHCO-TTF-OEt、Ph-NHCO

-TYF-OEt。

(10) tSXG

Ac-SRG、Ac-TRG、Ac-SRG-OEt、Ac-TRG-OEt、
Ph-NHCO-SRG、Ph-NHCO-TRG、Ph-NHCO-SRG-
OEt、Ph-NHCO-TRG-OEt。

(11) tSXH

Ac-SFH、Ac-SNH、Ac-SRH、Ac-SFH-OEt、Ac-
SNH-OEt、Ac-SRH-OEt、Ph-NHCO-SFH、Ph-
NHCO-SNH、Ph-NHCO-SRH、Ph-NHCO-SFH-OEt、
Ph-NHCO-SNH-OEt、Ph-NHCO-SRH-OEt。

(12) tSXI

a) N末アセチル、C末フリー体：

Ac-SGI、Ac-SMI、Ac-SPI、Ac-SVI、Ac-TDI、
Ac-TKI、Ac-TNI。

b) N末アセチル、C末エステル体：

Ac-SGI-OEt、Ac-SMI-OEt、Ac-SPI-OEt、Ac-
SVI-OEt、Ac-TDI-OEt、Ac-TKI-OEt、Ac-TNI-
OEt。

c) N末フェニルアミノカルボニル、C末フリー体：

Ph-NHCO-SGI、Ph-NHCO-SMI、Ph-NHCO-SPI、
Ph-NHCO-SVI、Ph-NHCO-TDI、Ph-NHCO-TKI、
Ph-NHCO-TNI。

d) N末フェニルアミノカルボニル、C末エステル体：

Ph-NHCO-SGI-OEt、Ph-NHCO-SMI-OEt、Ph-
NHCO-SPI-OEt、Ph-NHCO-SVI-OEt、Ph-NHCO

-TDI-OEt、Ph-NHCO-TKI-OEt、Ph-NHCO-TNI-OEt。

(13) tS XK

a) N末アセチル、C末フリー体：

Ac-SEK、Ac-SGK、Ac-SPK、Ac-SSK、Ac-TEK、
Ac-TIK、Ac-TSK、Ac-TTK。

b) N末アセチル、C末エステル体：

Ac-SEK-OEt、Ac-SGK-OEt、Ac-SPK-OEt、Ac-SSK-OEt、Ac-TEK-OEt、Ac-TIK-OEt、Ac-TSK-OEt、Ac-TTK-OEt。

c) N末フェニルアミノカルボニル、C末フリー体：

Ph-NHCO-SEK、Ph-NHCO-SGK、Ph-NHCO-SPK、
Ph-NHCO-SSK、Ph-NHCO-TEK、Ph-NHCO-TIK、
Ph-NHCO-TSK、Ph-NHCO-TTK。

d) N末フェニルアミノカルボニル、C末エステル体：

Ph-NHCO-SEK-OEt、Ph-NHCO-SGK-OEt、Ph-NHCO-SPK-OEt、Ph-NHCO-SSK-OEt、Ph-NHCO-TEK-OEt、Ph-NHCO-TIK-OEt、Ph-NHCO-TSK-OEt、Ph-NHCO-TTK-OEt。

(14) tS XM

Ac-TVM、Ac-TVM-OEt、Ph-NHCO-TVM、Ph-NHCO-TVM-OEt。

(15) tS XN

Ac-SMN、Ac-SNN、Ac-SSN、Ac-SMN-OEt、Ac-SNN-OEt、Ac-SSN-OEt、Ph-NHCO-SMN、Ph-

NHCO-SNN、Ph-NHCO-SSN、Ph-NHCO-SMN-OEt、
Ph-NHCO-SNN-OEt、Ph-NHCO-SSN-OEt。

(16) tSXP

Ac-SSP、Ac-STP、Ac-TRP、Ac-SSP-OEt、Ac-
STP-OEt、Ac-TRP-OEt、Ph-NHCO-SSP、Ph-
NHCO-STP、Ph-NHCO-TRP、Ph-NHCO-SSP-OEt、
Ph-NHCO-STP-OEt、Ph-NHCO-TRP-OEt。

(17) tSXQ

Ac-SDQ、Ac-SRQ、Ac-TAQ、Ac-SDQ-OEt、Ac-
SRQ-OEt、Ac-TAQ-OEt、Ph-NHCO-SDQ、Ph-
NHCO-SRQ、Ph-NHCO-TAQ、Ph-NHCO-SDQ-OEt、
Ph-NHCO-SRQ-OEt、Ph-NHCO-TAQ-OEt。

(18) tSXR

Ac-TAR、Ac-TDR、Ac-TAR-OEt、Ac-TDR-OEt、
Ph-NHCO-TAR、Ph-NHCO-TDR、Ph-NHCO-TAR-
OEt、Ph-NHCO-TDR-OEt。

(19) tSXS

a) N末アセチル、C末フリー体：

Ac-SCS、Ac-SQS、Ac-SSS、Ac-TQS、Ac-TSS。

b) N末アセチル、C末エステル体：

Ac-SCS-OEt、Ac-SQS-OEt、Ac-SSS-OEt、Ac-
TQS-OEt、Ac-TSS-OEt。

c) N末フェニルアミノカルボニル、C末フリー体：

Ph-NHCO-SCS、Ph-NHCO-SQS、Ph-NHCO-SSS、
Ph-NHCO-TQS、Ph-NHCO-TSS。

d) N末フェニルアミノカルボニル、C末エステル体:

Ph-NHCO-SCS-OEt、Ph-NHCO-SQS-OEt、Ph-NHCO-SSS-OEt、Ph-NHCO-TQS-OEt、Ph-NHCO-TSS-OEt。

(20) tSXT

Ac-TDT、Ac-TDT-OEt、Ph-NHCO-TDT、Ph-NHCO-TDT-OEt。

(21) tSXW

Ac-TAW、Ac-TAW-OEt、Ph-NHCO-TAW、Ph-NHCO-TAW-OEt。

(22) tSXY

Ac-SRY、Ac-TLY、Ac-SRY-OEt、Ac-TLY-OEt、Ph-NHCO-SRY、Ph-NHCO-TLY、Ph-NHCO-SRY-OEt、Ph-NHCO-TLY-OEt。

好ましい本発明の化合物としては、Ac-SLV、Ac-SFV、Ac-SIV、Ac-SRV、Ac-SVV、Ac-TLV、Ac-SLL、Ac-TTL、Ac-SLV-OMe、Ac-SFV-OMe、Ac-SIV-OMe、Ac-SRV-OMe、Ac-SVV-OMe、Ac-TLV-OMe、Ac-SLL-OMe、Ac-TTL-OMe、Ac-SLV-OEt、Ac-SFV-OEt、Ac-SIV-OEt、Ac-SRV-OEt、Ac-SVV-OEt、Ac-TLV-OEt、Ac-SLL-OEt、Ac-TTL-OEt、Ph-NHCO-SLV、Ph-NHCO-SFV、Ph-NHCO-SIV、Ph-NHCO-SRV、Ph-NHCO-SVV、Ph-NHCO-TLV、Ph-NHCO-SLL、Ph-NHCO-TTL、Ph-NHCO-SLV-OMe、Ph-NHCO-SFV-OMe、Ph-NHCO-SIV-OMe、

Ph-NHCO-SRV-OMe、Ph-NHCO-SVV-OMe、Ph-NHCO-TLV-OMe、Ph-NHCO-SLL-OMe、Ph-NHCO-TTL-OMe、Ph-NHCO-SLV-OEt、Ph-NHCO-SFV-OEt、Ph-NHCO-SIV-OEt、Ph-NHCO-SRV-OEt、Ph-NHCO-SVV-OEt、Ph-NHCO-TLV-OEt、Ph-NHCO-SLL-OEt、Ph-NHCO-TTL-OEt、Cyh-NHCO-SLV、Cyh-NHCO-SFV、Cyh-NHCO-SIV、Cyh-NHCO-SRV、Cyh-NHCO-SVV、Cyh-NHCO-TLV、Cyh-NHCO-SLL、Cyh-NHCO-TTL、Cyh-NHCO-SLV-OMe、Cyh-NHCO-SFV-OMe、Cyh-NHCO-SIV-OMe、Cyh-NHCO-SRV-OMe、Cyh-NHCO-SVV-OMe、Cyh-NHCO-TLV-OMe、Cyh-NHCO-SLL-OMe、Cyh-NHCO-TTL-OMe、Cyh-NHCO-SLV-OEt、Cyh-NHCO-SFV-OEt、Cyh-NHCO-SIV-OEt、Cyh-NHCO-SRV-OEt、Cyh-NHCO-SVV-OEt、Cyh-NHCO-TLV-OEt、Cyh-NHCO-SLL-OEt、Cyh-NHCO-TTL-OEt、Ph-CO-SLV、Ph-CO-SLV-OMe、Ph-CO-SLV-OEt、Cyh-CO-SLV、Cyh-CO-SLV-OMe、Cyh-CO-SLV-OEt

があげられる。

但し、上記化合物の略式表現において、Ac-、Ph-CO-、Cyh-CO-、Ph-NHCO-、およびCyh-NHCO-はN末端の修飾基を表しており、それぞれアセチル基、フェニルカルボニル基、シクロヘキシルカルボニル基、フェニルアミノカルボニル基、およびシクロヘキシルアミノカルボニル基を意味する。また、-OMe、-OEtおよびOiPrはそれぞれC末端のカルボキ

シル基がメチルエステル化、エチルエステル化およびイソプロピルエステル化されていることを意味する。配列中の $-\phi-(CH_2NH)-$ はアミド結合のカルボニル基が還元されていることを意味しており、 $-(NMe)X$ はアミノ酸のアミノ基がメチル化されていることを意味する。尚、配列中のDアミノ酸については(D) Xの記号で表している。

II. 本発明の化合物の合成法

本発明におけるペプチドは、以下に例示する著書において記載されている従来の固相合成法、液相法あるいは両者の組み合わせにより合成することができる：矢島治明（編）、「続医薬品の開発」、第14巻、廣川書店；軒原清史、有機合成化学協会誌、52巻、347ページ、1994年；あるいは、Gregory A. Grant（編）、「Synthetic Peptides : A User's Guide」、W. H. Freeman and Company 社。固相上で合成されたペプチドは、最後の残基の脱保護の後、必要に応じてN末端の修飾を行い、さらに固相（レジン）からの切り離しを行って得ることができる。ペプチド、および、それらの修飾体の純度ならびに構造確認は常法に従い、マスペクトル（イオンスプレーMS、FAB-MS、FD-MS）、HPLC、ならびに ^1H-NMR （500MHz）スペクトルで行った。

N末端の修飾体のうち、アセチル化はDMF（ジメチルホルムアミド）中、無水酢酸で処理することによって得られる。また、他のアシル化誘導体は、ペプチド合成と同様にカルボン酸化合物をN末端アミノ基に縮合することによって得るか、あるいはアセチル化と同様に酸無水物法によって得ることができる。さらに、ウレイド型の修飾は、DMF等の極性溶媒中、イソシアナート化合物と反応させることによって得ることができる。

また、固相上で合成されたペプチドおよびそれらの誘導体は、固相から切り離した後、塩酸メタノールあるいはジアゾメタン処理によってメチルエステル体に変換することができる。他のエステル体については、塩化水素等の適当な酸触媒の存

在下、アルコール化合物と縮合反応を行うことによって調製される。

更にまた、本発明化合物のペプチド誘導体中、そのアミド結合の一個あるいは複数個が還元されたことを特徴とする化合物は、「J. Med. Chem.」, 28巻, 1874頁(1985年)あるいは「特開平5-271273号」公報記載の方法に従って液層法で調製することができる。すなわち、当該化合物は、文献記載の方法(Org. Syn., 67巻, 69頁, 1988年)で調製したアルデヒド体を用いて、アミンを還元的にアルキル化するか、あるいはアミド部分をボラン還元することによって得ることができる。

本発明の化合物の薬学的に容認される塩は、例えばナトリウムおよびカリウムなどのアルカリ金属、カルシウムあるいはマグネシウムなどのアルカリ土類金属、あるいはジベンジルエチレンジアミン、トリエチルアミンおよびピペリジンのような有機の塩基、あるいは水酸化アンモニウムの適当量で、酸性残基を含む本発明の化合物を処理することによって調製される。また、塩基性残基を有する本発明の化合物は、硫酸、硝酸、塩酸、臭化水素酸、磷酸およびスルファミン酸などの無機酸、ならびに、蟻酸、酢酸、プロピオン酸、ピバリン酸、ジエチル酢酸、マロン酸、コハク酸、ピメリン酸、フマル酸、マレイン酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸、グルコン酸、アスコルビン酸、ニコチン酸、イソニコチン酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸およびラウリル硫酸などの有機酸と反応せしめることによって、その薬学的に容認される塩に導くことができる。

Ⅲ. 本発明の化合物の用途

本発明の化合物はレセプターのC末端の機能(RCR領域の機能)を調節する活性を有する。これらの化合物は、哺乳類のための、特にヒトのための医薬として有用である。本発明の化合物はレセプターの異常発現もしくはリガンドの異常発現により、レセプターからのシグナルが異常に伝達されることが原因となって

いる疾患、あるいは細胞内のレセプターのシグナルを伝達する因子の異常が原因となっている疾患のための医薬として有用である。たとえば、レセプターが Fas である場合、対応する本発明の化合物を癌の治療における用途のために患者に投与することができる。この場合本発明の化合物で治療できる癌の種類の場合は、結腸直腸癌、胃癌、肝癌、白血病、乳癌、卵巣癌を含むが、これらのものに限定されるものではない。レセプターが VIP レセプターである場合も、対応する本発明の化合物を癌の治療における用途のために患者に投与することができる。この場合本発明の化合物で治療できる癌の種類の場合は、肺癌を含むが、これらのものに限定されるものではない。レセプターが β_2 -アドレナジックレセプターである場合、対応する本発明の化合物を緑内障の治療における用途のために患者に投与することができる。また、非選択的 β -アドレナジックレセプター阻害剤の副作用の軽減における用途のために患者に投与することができる。レセプターが IL-8 レセプターである場合、対応する本発明の化合物を慢性関節リウマチ、痛風、好中球性皮膚炎、喘息、潰瘍性大腸炎、敗血症、成人呼吸切迫症候群、などの炎症を伴う疾患の治療における用途のために患者に投与することができる。ただし、この場合対応する本発明の化合物で治療できる炎症の種類の場合はこれらのものに限定されるものではない。

Fas、VIP レセプターの他に癌に関連している tSXX モチーフを有する細胞膜レセプターとして、transforming growth factor beta receptor III, insulin-like growth factor I receptor, growth hormone-releasing hormone receptor, somatostatin receptor 4, CTLA-4 counter-receptor B7-2, prolactin receptor long form, nerve growth factor receptor homolog, TGF-beta type II receptor, platelet-derived growth factor receptor beta, somatostatin receptor I, somatostatin receptor SSTR3, folate receptor type gamma, parathyroid hormone related peptide receptor, fibroblast growth factor

receptor 1, epidermal growth factor receptor HER4, nerve growth factor receptor あるいは transforming protein mas をあげることができる。これらのレセプターに対応する本発明の化合物、およびそれらの薬学的に容認される塩は、化学療法的利用が可能な抗腫瘍剤としての医薬組成物を提供し得る。

免疫・アレルギーに関連している S X X モチーフを有する細胞膜レセプターとして、Fas, luteinizing hormone-choriogonadotropin receptor 1, T-cell surface glycoprotein CD2, CTLA-4 counter-receptor B7-2, interleukin-5 receptor, G protein-coupled receptor BLR, leukocyte surface glycoprotein CD16, vasoactive intestinal peptide receptor, antigen CD97, cell adhesion receptor CD36, IgG Fc receptor IIa, bradykinin B2 receptor あるいは histamine H2 receptor をあげることができる。これらのレセプターに対応する本発明の化合物、およびそれらの薬学的に容認される塩は、免疫・アレルギー疾患治療剤としての医薬組成物を提供し得る。

造血系、血液凝固系に関連している t S X X モチーフを有する細胞膜レセプターとして、fibronectin receptor alpha chain, insulin-like growth factor I receptor, antigen CD97, cell adhesion receptor CD36, G-CSF receptor D7 あるいは u-plasminogen activator receptor form 2 をあげることができる。これらのレセプターに対応する本発明の化合物、およびそれらの薬学的に容認される塩は、血液疾患治療剤としての医薬組成物を提供し得る。

I L - 8 レセプターの他に炎症に関連している t S X X モチーフを有する細胞膜レセプターとして、transforming growth factor beta receptor III, prostaglandin E receptor subtype EP3C, prostanoid IP receptor, prostaglandin E receptor subtype EP1, G protein-coupled receptor BLR, nerve growth factor receptor homolog, TGF-beta typr II receptor, cell surface glycoprotein CD11c, secretory phospholipase A2 receptor

bradykinin B2 receptor あるいはhistamine H2 receptor をあげることができる。これらのレセプターに対応する本発明化合物、およびそれらの薬学的に容認される塩は、腎炎を含む炎症性疾患治療剤としての医薬組成物を提供し得る。

循環器系に関連している t S X Xモチーフを有する細胞膜レセプターとして、transforming growth factor beta receptor III, natriuretic peptide receptor C, prostaglandin E receptor subtype EP3C, prostanoid IP receptor, cannabinoid receptor CB2, natriuretic peptide receptor A ,adrenergic receptor alpha 1A, vasoactive intestinal peptide receptor, TGF-beta type II receptor, cell adhesion receptor CD36, nicotinic acetylcholine receptor beta-2 chain, platelet-derived growth factor receptor beta, beta-2-adrenergic receptor, endothelin receptor A subtype, glucagon-like peptide-1 receptor, endothelin receptor B, antidiuretic hormone receptor, beta-1-adrenergic receptor, serotonin receptor 5HT-2, serotonin receptor 5HT-1C, serotonin 5-HT2B receptor protein, あるいはalpha-2B-adrenergic receptor をあげることができる。これらのレセプターに対応する本発明の化合物、およびそれらの薬学的に容認される塩は、循環器系疾患治療剤としての医薬組成物を提供し得る。

脳・神経系に関連している t S X Xモチーフを有する細胞膜レセプターとして、glutamate receptor 6 kainate-preferring receptor , oxytocin receptor, insulin-like growth factor I receptor, protein-tyrosine kinase sky, somatostatin receptor 4, somatostatin receptor I, somatostatin receptor SSTR3, glutamate receptor GluR1, metabotropic glutamate receptor 5 B, metabotropic glutamate 5 A, G protein-coupled receptor GPR1, muscarinic acetylcholine receptor M3, thyropin-releasing hormone receptor, nerve growth factor receptor low affinity, VIP receptor, serotonin receptor 5HT-

2, serotonin receptor 5HT-1C, NMDA receptor chain 1, NMDA receptor modulatory chain hNR2A, corticotropin-releasing hormone receptor,あるいは melanocortin receptor 4 をあげることができる。これらのレセプターに対応する本発明の化合物、およびそれらの薬学的に容認される塩は、脳・神経系疾患治療剤としての医薬組成物を提供し得る。

骨疾患に関連している t S X Xモチーフを有する細胞膜レセプターとして、calcitonin receptor, parathyroid hormone related peptide receptorあるいは insulin-like growth factor I receptor をあげることができる。これらのレセプターに対応する本発明の化合物、およびそれらの薬学的に容認される塩は、骨疾患治療剤としての医薬組成物を提供し得る。

本発明の化合物は、哺乳類、好ましくはヒトに対して、単独で、あるいは、好ましくは、標準的な医薬慣行に従い薬学的に容認できる担体もしくは希釈剤と、随意に、適当な補助剤と組み合わせて医薬組成物として投与することができる。この医薬組成物は、経口的に、あるいは、静脈中、筋肉内、皮下、肛門内、および局所投与など非経口的に投与することができる。

本発明の化合物の経口的利用に関しては、選択した化合物（活性成分）を、例えば錠剤もしくはカプセルの形態として、あるいは、水溶液もしくは水性懸濁液として供与することができる。錠剤の場合には、通常使用されている担体、例えば乳糖、トウモロコシ澱粉などが用い得、かつ、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤も所望に応じて添加し得る。カプセル形態の場合には、有用な希釈剤として乳糖、乾燥トウモロコシ澱粉などが用い得る。水性懸濁液の場合には、活性成分を通常用いられている乳化用あるいは懸濁化用試薬と配合させればよい。いずれの場合とも所望に応じて特定の甘味用または香料用試薬を添加することができる。筋肉内、腹腔内、皮下および静脈内利用に関しては、活性成分の滅菌溶液を常法に応じて調製する。活性成分を含む溶液はpHを適宜調節し、かつ緩衝

化すべきである。特に、静脈内利用に関しては、溶質の総濃度を、最終調製物を等張にするように調節すべきである。

本発明は、特に、薬学的に容認される担体もしくは希釈剤と共に、もしくはこれらを含むことなく、薬学的有効量の本発明の化合物を含む医薬組成物に関する。このような組成物としては、本発明の化合物と共に、例えば、pH 7.4の生理食塩水のような薬学的に容認される担体とを含む水溶液の形態のものも含む。この溶液を局所的な全量一括 (bolus) 注射により、患者の筋肉内の血流内へ導入することができる。

本発明の化合物を活性成分としてヒト被験者内に投与する場合、1日の用量は、一般的には、年齢、体重、および、個々の患者の反応性、ならびに、患者の症状の重篤度により変化するため、最終的には担当の医師により決定される。具体的な例として、レセプターが Fas の場合には対応する化合物を癌の治療を受けているヒトの患者に投与するとして、1日当たり、約 0.001 mg/kg (ヒトの体重) から約 20 mg/kg 程度、好ましくは、1日当たり、0.005 mg/kg から約 10 mg/kg 程度で用いられるのが一般的である。

本発明の化合物を用いて後述のたとえば実施例 39~44 および 84~85 から明らかなように、細胞膜レセプターの C 末端の機能を解析することができる。このとき、細胞膜レセプターが発現している細胞あるいは組織に該レセプターのリガンドもしくはそのアゴニストを併用して行うことができる。レセプターとしては細胞膜レセプター全てが対象となり得るが前述の tSXX モチーフを有するレセプターも含む。具体的にはレセプターが Fas の場合、レセプターを有するがアポトーシスを起こさない癌細胞に有効量の抗 Fas 抗体あるいは Fas リガンドと本発明の化合物、例えば Ph-NHCO-SLV-OEt とを併用し、癌細胞にアポトーシスを誘導できれば Fas の RCR 領域がシグナルの抑制に働いていたことが明らかとなる。また、レセプターが VIP レセプターである場合、

有効量のVIPと本発明の化合物、例えばPh-NHCO-SLV-OEtとを併用し、VIPのシグナルが抑制されれば、VIPレセプターのRCR領域がシグナルの誘導に働いていたことが明らかとなる。他にレセプターとして β_2 -アドレナジックレセプターとIL-8レセプターの場合を例として示したが、いずれの場合とも本発明の化合物でレセプターのC末端領域がシグナル伝達に関与していること、さらにRCR領域がそのレセプターのシグナルに対して抑制的に働いているのか、誘導的に働いているのかが明らかとなった。このように、本発明の化合物は、細胞膜レセプターのC末端の機能を解析する方法において極めて有用であることがわかる。

本発明は細胞膜レセプターのC末端とその結合蛋白との結合を阻害することにより細胞膜レセプターのシグナル伝達を調節する方法を含む。また、本発明は細胞膜レセプターのシグナル異常が原因である疾病、もしくはシグナル異常が直接的な原因ではなくても細胞膜レセプターのシグナル伝達にかかわる疾病の治療に有効である。

例えば、既述のように、レセプターがFasである場合、FasとPTP-BASの結合を阻害することにより細胞死に関してFasからのシグナルを正に調節することができる。よって、Fasからのシグナルをこのように調節する方法は癌の治療に適応できる。また、Fasシグナルの異常は自己免疫疾患の原因になることが証明されており (Nagata, S. and P. Golstein(1995), "The Fas death factor", Science(Wash. DC), 267:1449-1456)、よって、上記の方法は免疫・アレルギー疾患の治療法となりうる。結合の阻害に関しては後述の実施例31、38、39、40、84に示すように、FasのC末端ペプチドSLVの誘導体を用いることができるが、これに限定されるものではない。

また、レセプターがVIPレセプターである場合、実施例41および44からVIPレセプターのC末端に結合するタンパクの存在が示唆されるが、該タンパ

クとの結合を阻害することにより、VIPの作用に関してVIPレセプターからのシグナルを負に調節することができる。VIPのアンタゴニストが非小細胞肺癌の増殖を抑制することから、VIPレセプターからのシグナルを負に調節する方法は肺癌の治療に適応できる。その際、結合の阻害にはVIPレセプターのC末端ペプチドSLVの誘導体を用いることができるが、これに限定されるものではない。また、VIPレセプターの発現は肺以外にも認められることから、シグナル伝達の調節による治療法の適用範囲は、肺癌に限定されるものではない。

β_2 -アドレナジックレセプターおよびIL-8レセプターについても、それぞれのC末端配列の一部を有するペプチド誘導体はその配列依存的にそれぞれのシグナルを調節することから、それらに結合する蛋白の存在が考えられる。よって、レセプターが β_2 -アドレナジックレセプターおよびIL-8レセプターの場合、これらと、未同定であるそれらのC末端結合蛋白との結合を阻害することによりシグナルを調節することができ、このような調節方法がシグナル伝達の異常に起因する疾病の治療に有効であろうことは容易に推量できる。

なお、本発明が対象とするレセプターは、細胞膜レセプター一般を指し、よって、上記の例にあげたレセプターに限定されるものではない。

実施例

本発明を以下の実施例によって詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によって何等限定されるものではない。

実施例1

Ｌ-セリル-Ｌ-ロイシル-Ｌ-バリン（SLV）の調製

Fmoc-Ｌ-バリンのついたWangレジン（400mg、0.2ミリモル相当）を出発原料として、Fmoc基（フルオレニルメチルオキシカルボニル基）を脱保護した後、Fmoc-Ｌ-ロイシン（0.5M溶液）とのカップリング反応を固相上で行った。Fmoc基の脱保護は20%ピペリジン（DMF溶液）を

用い、カップリング反応はD I C (ジイソプロピルカルボジイミド) ならびに H B T u (O-ベンゾトリアゾール-1-イル-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロフォスフェート) を用いて行った。さらに、ロイシンのN末端のF m o c基を同様に脱保護した後、F m o c-O-t-ブチル-L-セリンとのカップリング反応を同様にを行った。固相上合成されたペプチドは、N末端のF m o c基を脱保護した後、T F A (トリフルオロ酢酸) で処理することによって、セリン側鎖上の保護基 (t-ブチル基) の脱離とレジンからの切り離しを行った。得られたペプチドは常法に従って精製し、32.1mgのL-セリル-L-ロイシル-L-バリン (S L V) を得た。

F A B-M S (m/z) : 318 (MH^+)。

1H -NMR (δ , CD_3OD) : 0.95 (12H, m)、1.66 (3H, m)、2.16 (1H, m)、3.85 (1H, m)、3.94 (2H, m)、4.27 (1H, d, $J=6.1Hz$)、4.52 (1H, dd, $J=9.8, 4.9Hz$)。

実施例2

N-アセチル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (A c-S L V) の調製

実施例1と同様にW a n g レジン (90mg) を用い固相上で合成したペプチドのN末端に位置するF m o c基をピペリジンで脱保護した後、30%無水酢酸 (DMF溶液) で処理することにより、N末端アミノ基のアセチル化を行った。T F A処理により、実施例1と同様に側鎖上の脱保護とレジンからの切り離しを行い、3.7mgのN-アセチル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (A c-S L V) を得た。

F A B-M S (m/z) : 360 (MH^+)。

1H -NMR (δ , CD_3OD) : 0.95 (12H, m)、1.65 (3H,

m)、1.99 (3H, s)、2.15 (1H, m)、3.76 (2H, m)、
4.29 (1H, d, $J=6.1$ Hz)、4.44 (1H, t, $J=6.1$ Hz)、
4.48 (1H, dd, $J=4.9, 10.4$ Hz)。

実施例3

N-ベンゾイル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (Ph-CO-SLV) の調製

実施例1と同様にWangレジン (400mg) を用い固相上で合成したペプチドのN末端に位置するFmoc基をピペリジンで脱保護した後、安息香酸を用いて同様のカップリング反応を行い、さらにTFAで処理することにより、32.2mgのN-ベンゾイル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (Ph-CO-SLV) を得た。

FAB-MS (m/z) : 422 (MH^+)。

1H -NMR (δ , CD_3OD) : 0.95 (12H, m)、1.65 (2H, m)、1.75 (1H, m)、2.16 (1H, m)、3.90 (2H, m)、
4.29 (1H, d, $J=5.5$ Hz)、4.52 (1H, dd, $J=4.9, 9.8$ Hz)、4.68 (1H, t, $J=6.1$ Hz)、7.46 (2H, m)、
7.53 (1H, m)、7.87 (2H, d, $J=7.3$ Hz)。

実施例4

N-シクロヘキシルカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (Cyh-CO-SLV) の調製

実施例3の安息香酸の代わりにシクロヘキシルカルボン酸を用いて実施例3と同様にカップリング反応を行った後、TFA処理を行い、26.4mgのN-シクロヘキシルカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (Cyh-CO-SLV) を得た。

FAB-MS (m/z) : 428 (MH^+)。

$^1\text{H-NMR}$ (δ , CD_3OD) : 0.94 (12H, m)、1.28 (3H, m)、1.41 (2H, m)、1.66 (4H, m) 1.78 (4H, m)、2.15 (1H, m)、2.24 (1H, m)、3.73 (2H, m)、4.29 (1H, d, $J=5.5\text{Hz}$)、4.44 (2H, m)。

実施例5

N-フェニルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (Ph-NHCO-SLV) の調製

実施例2と同様にWangレジン(400mg)を用い固相上で合成したペプチドを無水酢酸溶液の代わりに、フェニルイソシアナート(2MのDMF溶液)で処理した後、TFAで側鎖上の脱保護とレジンからの切り離しを行い、51.2mgのN-フェニルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(Ph-NHCO-SLV)を得た。

FAB-MS (m/z) : 437 (MH^+)。

$^1\text{H-NMR}$ (δ , CD_3OD) : 0.95 (12H, m)、1.69 (3H, m)、2.17 (1H, m)、3.74 (1H, dd, $J=10.4, 6.1\text{Hz}$)、3.86 (1H, dd, $J=10.4, 4.9\text{Hz}$)、4.29 (1H, d, $J=5.5\text{Hz}$)、4.40 (1H, dd, $J=6.1, 4.9\text{Hz}$)、4.50 (1H, dd, $J=9.8, 4.9\text{Hz}$)、6.97 (1H, m)、7.24 (2H, m)、7.35 (2H, d, $J=8.5\text{Hz}$)。

実施例6

N-シクロヘキシルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (Cyh-NHCO-SLV) の調製

実施例5のフェニルイソシアナートの代わりにシクロヘキシルイソシアナート(2MのDMF溶液)を用い、38.2mgのN-シクロヘキシルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(Cyh-NHCO-SLV)を得た。

FAB-MS (m/z) : 443 (MH^+)。

1H -NMR (δ , CD_3OD) : 0.95 (12H, m)、1.17 (3H, m)、1.34 (3H, m)、1.60 (2H, m) 1.71 (3H, m)、1.85 (2H, m)、2.16 (1H, m)、3.47 (1H, m)、3.66 (1H, m)、3.78 (1H, dd, $J=10.4, 5.5Hz$)、4.29 (2H, m)、4.48 (1H, m)。

実施例7

N-アセチル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンメチルエステル (Ac-SLV-OMe) の調製

実施例2で得たN-アセチル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (Ac-SLV) 14.9mgを適当量のメタノールに溶解した後、ジアゾメタン(エーテル溶液)で処理することにより6.4mgのN-アセチル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンメチルエステル (Ac-SLV-OMe)を得た。

FD-MS (m/z) : 373 (M^+)。

1H -NMR (δ , $CDCl_3$) : 0.92 (12H, m)、1.56 (1H, m)、1.70 (2H, m)、2.03 (3H, s)、2.15 (1H, m)、3.63 (2H, m)、3.74 (3H, s)、4.04 (1H, br d, $J=11.0Hz$)、4.41 (1H, m)、4.54 (2H, m)、6.48 (1H, d, $J=6.7Hz$)、6.69 (1H, d, $J=8.5Hz$)、6.77 (1H, d, $J=7.3Hz$)

実施例8

N-フェニルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンメチルエステル (Ph-NHCO-SLV-OMe) の調製

実施例5で得たN-フェニルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (Ph-NHCO-SLV) 15.3mgを実施例7と同様にジアゾメタンで処理し、8.2mgのN-フェニルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンメチルエステル (Ph-NHCO-SLV-OMe) を得た。

FAB-MS (m/z) : 451 (MH^+)。

1H -NMR (δ , $CDCl_3$) : 0.90 (12H, m)、1.69 (3H, m)、2.14 (1H, m)、3.65 (1H, m)、3.72 (3H, s)、4.02 (1H, dd, $J=7.3, 3.1$ Hz)、4.54 (3H, m)、6.15 (1H, d, $J=7.3$ Hz)、7.04 (1H, t, $J=7.3$ Hz)、7.20 (2H, t, $J=7.9$ Hz)、7.30 (2H, overlapped)。

実施例9

N-シクロヘキシルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンメチルエステル (Cyh-NHCO-SLV-OMe) の調製

実施例6で得たN-シクロヘキシルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (Cyh-NHCO-SLV) 15mgを実施例7と同様にジアゾメタンで処理し、4.8mgのN-シクロヘキシルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンメチルエステル (Cyh-NHCO-SLV-OMe) を得た。

FD-MS (m/z) : 457 (MH^+)。

1H -NMR (δ , $CDCl_3$) : 0.91 (12H, m)、1.12 (3H,

m)、1.34 (2H, m)、1.5-1.7 (6H)、1.90 (2H, m)、2.15 (1H, m)、3.51 (1H, m)、3.63 (1H, dd, $J=11.0, 6.1$ Hz)、3.73 (3H, s)、4.01 (1H, dd, $J=11.0, 3.7$ Hz)、4.44 (2H, m)、4.53 (1H, dd, $J=8.9, 5.2$ Hz)、5.55 (1H, br)、7.05 (1H, d, $J=9.1$ Hz)。

実施例10

N-[4-メチル-2(S)-(N-アセチル-L-セリル)アミノ-ペン
ト-1-イル]-L-バリンメチルエステル (Ac-SL- ϕ -(CH₂NH)-
V-OMe) の調製

N-アセチル-O-t-ブチル-L-セリン (210mg) と N-[4-メチル-2(S)-アミノ-ペン
ト-1-イル]-L-バリンメチルエステル (340mg) をジオキサン (1.0ml) に溶解した後、1-ヒドロキシベンズトリアゾ
ール・1水和物 (140mg) とジシクロヘキシルカルボジイミド (210mg) を
添加し、反応液を室温で17時間攪拌した。不溶物を濾過で除去した後、シリカ
ゲルクロマトグラフィーで精製し、181mgのN-[4-メチル-2(S)-
(N-アセチル-O-t-ブチル-L-セリル)アミノ-ペン
ト-1-イル]-L-バリンメチルエステルを主生成物として得た。

さらに上記生成物181mgを95%TFA溶液で8時間処理した後、調製用薄
層クロマトグラフィーで精製し、69mgのN-[4-メチル-2(S)-(N-
アセチル-L-セリル)アミノ-ペン
ト-1-イル]-L-バリンメチルエス
テル: (Ac-SL- ϕ -(CH₂NH)-V-OMe) を得た。

FD-MS (m/z): 360 (MH^+)。

¹H-NMR (δ , CDCl₃): 0.91 (12H, m)、1.28 (1H, m)、1.37 (1H, m)、1.61 (1H, m)、1.95 (1H, m)、

2. 02 (3H, s)、2. 37 (1H, dd, $J=11.6, 7.9$ Hz)、
2. 67 (1H, dd, $J=11.6, 4.3$ Hz)、2. 81 (1H, br),
3. 01 (1H, d, $J=5.5$ Hz)、3. 54 (1H, dd, $J=11.6,$
7. 3 Hz)、3. 72 (3H, s)、3. 94 (1H, dd, $J=11.6,$
4. 3 Hz)、4. 10 (1H, m)、4. 48 (1H, m)、6. 50 (1H,
d, $J=9.2$)、6. 63 (1H, d, $J=6.7$ Hz)。

実施例11

N-[4-メチル-2(S)-(N-アセチル-L-セリル)アミノ-ペン
-1-イル]-L-バリン (Ac-SL- ϕ -(CH₂NH)-V) の調製

10mgのN-[4-メチル-2(S)-(N-アセチル-L-セリル)アミ
ノ-ペン-1-イル]-L-バリンメチルエステルを1.0mlのメタノール
に溶解した後、4等量の水酸化リチウム水溶液(0.5ml)を添加し、アルゴ
ン雰囲気下、室温で12時間攪拌した。反応液を中和した後、イオン交換クロマ
トグラフィーによって目的とするN-[4-メチル-2(S)-(N-アセチル
-L-セリル)アミノ-ペン-1-イル]-L-バリン (Ac-SL- ϕ -(
CH₂NH)-V) を5.4mg得た。

FD-MS (m/z) : 346 (MH^+)。

¹H-NMR (δ , CD₃OD) : 0. 92 (3H, d, $J=6.7$ Hz)、
0. 95 (3H, d, $J=6.7$ Hz)、1. 04 (3H, d, $J=6.7$ Hz)
、1. 10 (3H, d, $J=6.7$ Hz)、1. 33 (1H, m)、1. 54
(1H, m)、1. 70 (1H, m)、2. 01 (3H, s)、2. 22 (1H,
m)、2. 95 (1H, br dd, $J=12.8, 9.8$ Hz)、3. 20
(1H, br d, $J=12.8$ Hz)、3. 38 (1H, br)、3. 75
(1H, dd, $J=10.4, 5.5$ Hz)、3. 82 (1H, dd, $J=$
10. 4, 4. 8 Hz)、4. 27 (1H, m)、4. 32 (1H, m)

実施例12

N-アセチル-D-セリル-L-ロイシル-L-バリン (Ac-(D)SLV)

の調製

実施例1のFmoc-O-t-ブチル-L-セリンの代わりに、Fmoc-O-t-ブチル-D-セリンを用い、Wangレジン(400mg)上でペプチドを合成した後、実施例2と同様に処理することによって15.4mgのN-アセチル-D-セリル-L-ロイシル-L-バリン(Ac-(D)SLV)を得た。

FAB-MS (m/z) : 360 (MH^+)。

1H -NMR (δ , CD_3OD) : 0.95 (12H, m)、1.62 (2H, m)、1.68 (1H, m)、2.00 (3H, s)、2.16 (1H, m)、3.76 (2H, m)、4.29 (1H, d, $J=5.5Hz$)、4.40 (1H, t, $J=5.5Hz$)、4.47 (1H, dd, $J=9.2, 5.5Hz$)。

実施例13

N-アセチル-N-メチル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (Ac-(NMe)SLV) の調製

実施例1のFmoc-O-t-ブチル-L-セリンの代わりに、Fmoc-N-メチル-O-ベンジル-L-セリンを用い、Wangレジン(400mg)上でペプチドを合成した後、実施例2と同様に処理することによって90.7mgのN-アセチル-N-メチル-O-ベンジル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンを得た。このうち26.9mgをエタノールに溶解し、水酸化パラジウムを触媒とし、水素雰囲気下2.5時間攪拌した。触媒を濾過によって除いた後、濾液を濃縮することによって目的とするN-アセチル-N-メチル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(Ac-(NMe)SLV)を0.68mg得た。

FAB-MS (m/z) : 374 (MH^+)。

1H -NMR (δ , CD_3OD) : 0.95 (12H, m)、1.63 (3H, m)、2.15 (3H, s)、2.18 (1H, m)、2.65 (3H, s)、3.88 (1H, m)、3.97 (1H, m)、4.27 (1H, m)、4.45 (1H, m)、4.60 (1H, m)。

実施例14

N-アセチル-L-セリル-L-グルタミル-L-バリン (Ac-SEV) の調製

実施例1のFmoc-L-ロイシンの代わりに、Fmoc-L-グルタミン酸を用い、Wangレジン (400mg) 上でペプチドを合成した後、実施例2と同様に処理することによって55.1mgのN-アセチル-L-セリル-L-グルタミル-L-バリン (Ac-SEV) を得た。

FAB-MS (m/z) : 376 (MH^+)。

1H -NMR (δ , CD_3OD) : 0.97 (6H, m)、1.93 (1H, m)、2.01 (3H, s)、2.16 (2H, m)、2.43 (2H, m)、3.74 (1H, dd, $J=11.0, 5.5Hz$)、3.80 (1H, dd, $J=11.0, 5.5Hz$)、4.29 (1H, d, $J=5.5Hz$)、4.42 (1H, t, $J=5.5Hz$)、4.49 (1H, dd, $J=8.1, 4.4Hz$)。

実施例15

N-アセチル-L-セリル-L-リジル-L-バリン (Ac-SKV) の調製

実施例1のFmoc-L-ロイシンの代わりに、Fmoc-L-リジンをを用い、Wangレジン (400mg) 上でペプチドを合成した後、実施例2と同様に処理することによって63.6mgのN-アセチル-L-セリル-L-リジル-L

ーバリン (Ac-SKV) を得た。

FAB-MS (m/z) : 375 (MH^+)。

1H -NMR (δ , CD_3OD) : 0.96 (6H, br d, $J=6.7Hz$)、1.49 (2H, m)、1.68 (3H, m)、1.93 (1H, m)、2.00 (3H, s)、2.17 (1H, m)、2.92 (2H, br t, $J=7Hz$)、3.77 (2H, m)、4.30 (1H, br d, $J=6Hz$)、4.36 (1H, br t, $J=7Hz$)、4.49 (1H, br dd, $J=9.5Hz$)。

実施例16

N-アセチル-L-セリル-L-フェニルアラニル-L-バリン (Ac-SFV) の調製

実施例1のFmoc-L-ロイシンの代わりに、Fmoc-L-フェニルアラニンを用い、Wangレジン (400mg) 上でペプチドを合成した後、実施例2と同様に処理することによって43.3mgのN-アセチル-L-セリル-L-フェニルアラニル-L-バリン (Ac-SFV) を得た。

FAB-MS (m/z) : 394 (MH^+)。

1H -NMR (δ , CD_3OD) : 0.95 (6H, m)、1.96 (3H, m)、2.14 (1H, m)、2.93 (1H, m)、3.19 (1H, m)、3.68 (2H, d, $J=6.1Hz$)、4.28 (1H, m)、4.39 (1H, m)、4.71 (1H, m)、7.24 (5H, m)。

実施例17

N-アセチル-L-セリル-L-イソロイシル-L-バリン (Ac-SIV) の調製

実施例1のFmoc-L-ロイシンの代わりに、Fmoc-L-イソロイシンを用い、Wangレジン (400mg) 上でペプチドを合成した後、実施例2と

同様に処理することによって10.9mgのN-アセチル-L-セリル-L-イソロイシル-L-バリン (Ac-SIV) を得た。

FAB-MS (m/z) : 360 (MH^+)。

1H -NMR (δ , CD_3OD) : 0.95 (12H, m)、1.19 (1H, m)、1.54 (1H, m)、1.89 (1H, m)、2.00 (3H, s)、2.15 (1H, m)、3.74 (2H, m)、4.29 (1H, d, $J=6.1Hz$)、4.34 (1H, d, $J=7.3Hz$)、4.47 (1H, m)。

実施例18

N-アセチル-L-セリル-L-バリル-L-バリン (Ac-SVV) の調製

実施例1のFmoc-L-ロイシンの代わりに、Fmoc-L-バリンを用い、Wangレジン (400mg) 上でペプチドを合成した後、実施例2と同様に処理することによって39.0mgのN-アセチル-L-セリル-L-バリル-L-バリン (Ac-SVV) を得た。

FAB-MS (m/z) : 346 (MH^+)。

1H -NMR (δ , CD_3OD) : 0.97 (12H, m)、2.01 (3H, s)、2.14 (2H, m)、3.74 (1H, dd, $J=11.0, 6.1Hz$)、3.76 (1H, dd, $J=11.0, 5.5Hz$)、4.30 (2H, m)、4.48 (1H, t, $J=6.1Hz$)。

実施例19

N-アセチル-L-スレオニル-L-ロイシル-L-バリン (Ac-TLV) の調製

実施例1のFmoc-O-tert-ブチル-L-セリンの代わりに、Fmoc-O-tert-ブチル-L-スレオニンを用い、Wangレジン (400mg) 上でペプチドを合成した後、実施例2と同様に処理することによって14.8mgのN-アセチル-L-スレオニル-L-ロイシル-L-バリン (Ac-TLV) を得た。

FAB-MS (m/z) : 374 (MH^+)。

1H -NMR (δ , CD_3OD) : 0.92 (3H, d, $J=6.7Hz$)、
0.96 (9H, m)、1.17 (3H, d, $J=6.7Hz$)、1.61
(2H, m)、1.71 (1H, m)、2.03 (3H, s)、2.16 (1H,
m)、4.10 (1H, m)、4.28 (1H, d, $J=5.5Hz$)、
4.35 (1H, d, $J=4.9Hz$)、4.52 (1H, dd, $J=9.5$,
5.8Hz)。

実施例20

N-アセチル-L-セリル-L-ロイシル-L-イソロイシン (Ac-SLI)

の調製

実施例1のFmoc-L-バリンのついたWangレジンの代わりに、
Fmoc-L-イソロイシンのついたWangレジン (180mg) を用いて固
相上でペプチドを合成を行った後、実施例2と同様に処理することによって
3.6mgのN-アセチル-L-セリル-L-ロイシル-L-イソロイシン
(Ac-SLI) を得た。

FAB-MS (m/z) : 374 (MH^+)。

1H -NMR (δ , CD_3OD) : 0.91 (12H, m)、1.21 (1H,
m)、1.51 (1H, m)、1.62 (2H, m)、1.72 (1H, m)、
1.87 (1H, m)、2.00 (3H, s)、3.75 (2H, m) 4.31
(1H, d, $J=5.5Hz$)、4.45 (2H, m)。

実施例21

N-アセチル-L-アルギニル-L-アスパラギニル-L-グルタミル-L-
イソロイシル-L-グルタミニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン
(Ac-RNEIQSLV) およびN-アセチル-L-グルタミニル-L-セリ
ル-L-ロイシル-L-バリン (Ac-QSLV) の調製

実施例2と同様にして、N-アセチル-L-アルギニル-L-アスパラギニル-L-グルタミル-L-イソロイシル-L-グルタミニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (Ac-RNEIQSLV) およびN-アセチル-L-グルタミニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (Ac-QSLV) を調製した。

Ac-RNEIQSLV

Ion spray-MS (m/z) : 1000.1 (MH^+)。

Ac-QSLV

Ion spray-MS (m/z) : 487.5 (M^+)。

1H -NMR (δ , CD_3OD) : 0.96 (12H, m)、1.65 (5H, m)、1.99 (3H, s)、2.16 (1H, m)、2.31 (2H, m)、3.76 (1H, m)、3.83 (1H, m)、4.30 (2H, m) 4.42 (1H, m)、4.49 (1H, m)。

実施例22

N-アセチル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンエチルエステル (Ac-SLV-OEt) の調製

L-ロイシル-L-バリンエチルエステル (1.82 g) とN-tert-ブトキシ-O-ベンジル-L-セリン (2.09 g) をDMF (30 ml) に溶解し、ヒドロキシベンズotリアゾール・1水和物 (HOBt、0.96 g) の存在下、N-エチル-N'-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド・1塩酸塩 (EDC·HCl、1.40 g) を縮合剤として85分間、室温で反応させた。反応液を酢酸エチルと水で振り分け、得られた有機層を飽和食塩水、飽和重曹水で洗浄し、芒硝で乾燥した後、減圧乾固した。乾燥生成物をTFA (6 ml) と水 (0.3 ml) の混合液に溶解し、室温で40分間反応させた後、減圧濃縮にてTFAを除去した。反応生成物を酢酸エチルと飽和重曹水で振り分け、有機層を飽和食塩

水で洗浄し、芒硝で乾燥したのち濃縮し、O-ベンジル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンエチルエステル (3.08 g) を得た。

次に、O-ベンジル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンエチルエステル (0.3 g) をジクロロメタン (CH_2Cl_2 、2 ml) に溶解し、無水酢酸 (80 μl) とトリエチルアミン (120 μl) を加え、室温で18時間反応させた。反応液に水を加えクロロホルムで抽出した後、抽出物を濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製を行い、N-アセチル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンエチルエステル (0.33 g) を得た。

さらに、N-アセチル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンエチルエステル (0.33 g) をメタノール (10 ml) に溶解し、水酸化パラジウム-炭素を触媒として、水素雰囲気下室温で15時間接触還元を行った。触媒を除去した後、濃縮乾固し、目的物であるN-アセチル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンエチルエステル (Ac-SLV-OEt) を215 mg得た。

FAB-MS (m/z) : 388 (MH^+)。

$^1\text{H-NMR}$ (δ , CDCl_3) : 0.88-0.96 (12H, m)、
1.28 (3H, t, $J=7.3\text{ Hz}$)、1.55-1.75 (3H, m)、
2.03 (3H, s)、2.15 (1H, m)、3.61 (1H, m)、
3.92 (1H, br)、4.00 (1H, m)、4.20 (2H, m)、
4.47 (1H, m)、4.53 (1H, m)、4.59 (1H, m)、
6.61 (1H, d, $J=7.4\text{ Hz}$)、6.86 (1H, d, $J=8.6\text{ Hz}$)、
7.06 (1H, d, $J=7.9\text{ Hz}$)。

実施例23

N-フェニルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンエチルエステル (Ph-NHCO-SLV-OEt) の調製

実施例22で得られたO-ベンジル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンエチルエステル(0.5g)をDMF(5ml)に溶解し、フェニルイソシアナート(0.13ml)を加えて室温で15時間反応させた。実施例22と同様に処理し、390mgのN-フェニルアミノカルボニル-O-ベンジル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンエチルエステルを得た。

次に、N-フェニルアミノカルボニル-O-ベンジル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンエチルエステル(350mg)をエタノール(10ml)とDMF(10ml)の混合溶媒に溶解し、実施例22と同様に接触還元を行い目的とするN-フェニルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンエチルエステル(Ph-NHCO-SLV-OEt)を249mg得た。

FAB-MS (m/z) : 465 (MH^+)。

1H -NMR (δ , $CDCl_3$) : 0.88-0.92 (12H, m)、1.28 (3H, t, $J=7.3$ Hz)、1.57 (1H, m)、1.69 (2H, m)、2.15 (1H, m)、3.66 (1H, dd, $J=11.0, 7.3$ Hz)、3.91 (1H, dd, $J=11.0, 4.9$ Hz)、4.17 (2H, m)、4.48 (3H, m)、7.00 (1H, t, $J=7.3$ Hz)、7.24 (1H, dd, $J=7.9, 7.3$ Hz)、7.33 (1H, d, $J=7.9$ Hz)。

実施例24

N-シクロヘキシルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンエチルエステル (Cyh-NHCO-SLV-OEt) の調製

実施例23のフェニルイソシアナートの代わりにシクロヘキシルイソシアナートを用い、以下同様に処理することによって、目的とするN-シクロヘキシルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンエチルエステル (Cyh-NHCO-SLV-OEt) を204mg得た。

FAB-MS (m/z) : 471 (MH^+)。

1H -NMR (δ , $CDCl_3$) : 0.90-0.96 (12H, m)、
1.14 (3H, m)、1.28 (3H, t, $J=7.3$ Hz)、1.34
(2H, m)、1.58 (2H, m)、1.69 (4H, m)、1.87 (2H,
m)、2.15 (1H, m)、3.48 (1H, m)、3.60 (1H, dd,
 $J=11.0, 6.7$ Hz)、3.83 (1H, dd, $J=11.0, 4.9$ Hz)、
4.18 (2H, m)、4.31 (1H, dd, $J=6.5, 5.2$ Hz)、4.43 (2H, m)。

実施例25

N-アセチル-L-セリル-L-ロイシル-L-アラニンエチルエステル (Ac-SLA-OEt) の調製

L-ロイシル-L-アラニンエチルエステル (0.50 g) と N-Fmoc-O-*t*-ブチル-L-セリン (0.83 g) を DMF (10 ml) に溶解し、ヒドロキシベンズトリアゾール・1水和物 (HOBt, 0.30 g) の存在下、N-エチル-N'-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド・1塩酸塩 (EDC·HCl, 0.45 g) を縮合剤として3.5時間、室温で反応させた。反応液を酢酸エチルと水で振り分け、得られた有機層を飽和食塩水、飽和重曹水で洗浄し、芒硝で乾燥した後、減圧乾固した。乾燥生成物を20%ピペリジン-DMF溶液 (10 ml) に溶解し、室温で50分間反応させた後、酢酸エチルと飽和重曹水で振り分けた。有機層を飽和食塩水で洗浄し、芒硝で乾燥したのち濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製することにより、O-*t*-ブチル-L-セリル-L-ロイシル-L-アラニンエチルエステル (0.59 g) を得た。

次に、O-*t*-ブチル-L-セリル-L-ロイシル-L-アラニンエチルエステル (163 mg) をジクロロメタン (CH_2Cl_2 , 1 ml) に溶解し、無水酢酸 (45 μ l) とトリエチルアミン (75 μ l) を加え、室温で8時間反応さ

せた。反応液に水を加えクロロホルムで抽出した後、抽出物を濃縮し、N-アセチル-O-t-ブチル-L-セリル-L-ロイシル-L-アラニンエチルエステル (130mg) を得た。

さらに、N-アセチル-O-t-ブチル-L-セリル-L-ロイシル-L-アラニンエチルエステル (130mg) をTFA (2ml) に溶解し、水 (0.1ml) を加え室温で45分間攪拌した。酢酸エチルと水で振り分け、得られる有機層を飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄後、芒硝で乾燥した。濃縮乾固して得られる固体をエーテル/ヘキサンで洗浄し、目的物であるN-アセチル-L-セリル-L-ロイシル-L-アラニンエチルエステル (Ac-SLA-OEt) を25mg得た。

FAB-MS (m/z) : 360 (MH^+)。

1H -NMR (δ , $CDCl_3$) : 0.93 (3H, d, $J=6.1$ Hz)、0.95 (3H, d, $J=6.1$ Hz)、1.28 (3H, t, $J=7.3$ Hz)、1.40 (3H, d, $J=6.7$ Hz)、1.55-1.75 (3H, m)、2.04 (3H, s)、3.61 (1H, dd, $J=11.0, 7.3$ Hz)、4.04 (1H, dd, $J=11.0, 4.3$ Hz)、4.20 (2H, m)、4.43 (1H, m)、4.52 (2H, m)、6.55 (1H, d, $J=7.3$ Hz)、6.75 (1H, d, $J=7.3$ Hz)、6.81 (1H, d, $J=7.9$ Hz)。

実施例26

N-フェニルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-アラニンエチルエステル (Ph-NHCO-SLA-OEt) の調製

実施例22で得られたO-t-ブチル-L-セリル-L-ロイシル-L-アラニンエチルエステル (0.4g) をDMF (5ml) に溶解し、フェニルイソシアナート (0.15ml) を加えて室温で80分間反応させた。実施例23と同

様に処理し、396mgのN-フェニルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-アラニンエチルエステルを得た。

次に、N-フェニルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-アラニンエチルエステル(390mg)をTFA(5ml)と水(0.25ml)の混合溶媒に溶解し、実施例25と同様に処理し目的とするN-フェニルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-アラニンエチルエステル(Ph-NHCO-SLA-OEt)を318mg得た。

FD-MS (m/z) : 436 (M^+)。

$^1\text{H-NMR}$ (δ , CDCl_3) : 0.89 (3H, d, $J=5.5\text{Hz}$)、0.92 (3H, d, $J=6.1\text{Hz}$)、1.22 (3H, t, $J=7.0\text{Hz}$)、1.33 (3H, d, $J=7.3\text{Hz}$)、1.5-1.75 (3H, m)、3.72 (1H, dd, $J=11.0, 6.7\text{Hz}$)、3.97 (1H, dd, $J=11.0, 4.3\text{Hz}$)、4.12 (2H, m)、4.49 (1H, m)、4.62 (1H, m)、4.81 (1H, m)、6.56 (1H, t, $J=7.3\text{Hz}$)、6.98 (1H, t, $J=7.3\text{Hz}$)、7.18 (2H, t, $J=7.9\text{Hz}$)、7.25 (2H, overlapped)、7.61 (2H, br)。

実施例27

N-フェニルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-アラニン(Ph-NHCO-SLA)の調製

実施例26で得られたN-フェニルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-アラニンエチルエステル(50mg)をメタノール(1ml)と水(0.25ml)の混合溶媒に溶解し、水酸化リチウム・1水和物(20mg)を加えて室温で4.5時間反応させた。反応液を酢酸エチルと1N-HClで振り分け、得られた有機層を食塩水で洗浄、芒硝で乾燥後、減圧濃縮し白色個体を

得た。これをエーテルで洗浄することにより、目的とするN-フェニルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-アラニン (Ph-NHCO-SLA) を33mg得た。

FD-MS (m/z) : 409 (MH⁺)

¹H-NMR (δ, CDCl₃) : 0.90-0.95 (6H, m)、
1.22 (3H, t, J=7.0Hz)、1.40 (3H, m)、1.55-
1.75 (3H, m)、3.70 (1H, m)、3.92 (1H, m)、
4.35-4.45 (3H, m)、4.62 (1H, m)、7.0 (1H, br
t, J=7.3Hz)、7.28 (2H, m)、7.36 (2H, br d, J
=8.5Hz)。

実施例28

N-フェニルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-ロイシンエチルエステル：(Ph-NHCO-SLL-OEt)の調製

実施例5と同様に、Fmoc-L-ロイシンのついたWangレジン (600mg) から139.2mgのN-フェニルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-ロイシン (Ph-NHCO-SLL) を得た。

次に、51.3mgのN-フェニルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-ロイシン (Ph-NHCO-SLL) を1.0mlの塩酸エタノール溶液に溶解し、室温で3.5時間攪拌した。反応液を中和後、水と酢酸エチルで振り分け、得られた有機層を芒硝で乾燥後、減圧濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、20.6mgのN-フェニルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-ロイシンエチルエステル (Ph-NHCO-SLL-OEt) を得た。

FD-MS (m/z) : 479 (MH⁺)

¹H-NMR (δ, CD₃OD) : 0.93 (12H, m), 1.25 (3H,

t, $J=7.3\text{ Hz}$)、1.58–1.72 (6H, m)、3.72 (1H, dd, $J=10.4, 6.1\text{ Hz}$)、3.86 (1H, dd, $J=10.4, 5.5\text{ Hz}$)、4.14 (2H, m)、4.37 (1H, dd, $J=6.1, 5.5\text{ Hz}$)、4.40 (1H, dd, $J=9.8, 5.5\text{ Hz}$)、4.48 (1H, dd, $J=10.4, 4.3\text{ Hz}$)、6.97 (1H, t, $J=7.3\text{ Hz}$)、7.24 (2H, dd, $J=8.5, 7.3\text{ Hz}$)、7.36 (2H, d, $J=8.5\text{ Hz}$)。

実施例29

N-フェニルアミノカルボニル-L-スレオニル-L-スレオニル-L-ロイシンエチルエステル: (Ph-NHCO-TTL-OEt) の調製

実施例28と同様に、Fmoc-L-ロイシンのついたWangレジン (600mg) から138.5mgのN-フェニルアミノカルボニル-L-スレオニル-L-スレオニル-L-ロイシン (Ph-NHCO-TTL) を得た。

次に、29.5mgのN-フェニルアミノカルボニル-L-スレオニル-L-スレオニル-L-ロイシン (Ph-NHCO-TTL) を1.0mlの塩酸エタノール溶液に溶解し、0℃で2時間攪拌した。実施例28と同様に処理し、10.2mgのN-フェニルアミノカルボニル-L-スレオニル-L-スレオニル-L-ロイシンエチルエステル: (Ph-NHCO-TTL-OEt) を得た。

FD-MS (m/z) : 481 (MH^+)。

$^1\text{H-NMR}$ (δ , CD_3OD) : 0.89 (6H, m), 1.25 (9H, m)、1.59–1.66 (3H, m)、4.15 (2H, m)、4.25 (2H, m)、4.30 (1H, d, $J=3.7\text{ Hz}$)、4.36 (1H, d, $J=4.3\text{ Hz}$)、4.43 (1H, m)、6.94 (1H, t, $J=7.3\text{ Hz}$)、7.24 (2H, dd, $J=8.6, 7.3\text{ Hz}$)、7.38 (2H, d, $J=8.6\text{ Hz}$)。

参考例 1大腸癌における PTP-BAS の発現

ヒト大腸癌細胞株 HT-29 (ATCC HTB-38), WiDr (ATCC CCL-218), DLD-1 (ATCC CCL-221), LS-180 (ATCC CL-187), LS-174T (ATCC CL-188), COLO205 (ATCC CCL-222), LoVo (ATCC CCL-229), SW480 (ATCC CCL-228) より Quick PrepTM Micro mRNA Purification Kit (ファルマシアバイオテック社) を用いて、それぞれの細胞の mRNA を調製した。つぎに、この mRNA より、SuperScriptTM Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Life Technologies 社) を用いた RT-PCR 法により cDNA を調製した。この cDNA を用いて PCR 法により PTP-BAS の発現を調べた。すなわち、12.5 ng/μl から 0.78 ng/μl に調製した cDNA 4 μl を、PTP-BAS 特異的プライマー (5' primer: 5' - GAATACGAGTGTCAGACATGG-3', 3' primer: 5' - AGGTCTGCAGAGAAGCAAGAATAC-3') 10 μM を含む PCR 反応液 (Recombinant Taq DNA Polymerase, TaKaRa Taq、宝酒造社) 21 μl に加え、35 サイクルで PCR を実施した。PCR 反応産物 25 μl をエチジウムブロマイド (0.3 μg/ml) を含むアガロースゲル (2%) 中で電気泳動し、紫外線照射下で写真撮影した。PTP-BAS プライマーによる 607 bp の PCR 反応産物が確認された細胞において、PTP-BAS が発現していると判定した。表に示すとおり、8 株中 5 株に PTP-BAS の発現が認められた。

第1表 大腸癌におけるPTP-BASの発現

大腸癌細胞	PTP-BASの発現
HT-29	+
WiDr	+
DLD-1	+
LS-180	+
LS-174T	-
COLO205	-
LoVo	+
SW480	-

実施例30

インビトロでのFasとPTP-BASの結合阻害

Glutathione S-transferaseとFasとの融合蛋白は、ベクターpGEX-2T (ファルマシア社) にFas (Ito 他、1991年、前述) のアミノ酸191-335をコードする遺伝子をつなぎ、大腸菌で発現させ調製した。固相化したGST-Fas融合蛋白は、大腸菌で発現させたGST-Fas (アミノ酸191-335) 融合蛋白をGlutathione Sepharose 4B (ファルマシア社) と共にインキュベーションして作製した。PTP-BASフラグメント1遺伝子は、PTP-BAS (Maekawa 他、前述) のFasとの結合領域を含む領域 (アミノ酸1279-1883) をコードする遺伝子をBluescript pSK-11 (Stratagene社) につないで作製した。 [³⁵S] PTP-BASフラグメント1は、PTP-BASフラグメント1遺伝子のTNT Reticulocyte Lysate System (Promega社) を用いたインビトロトランスレーションにより調製した。

FasとPTP-BASの結合阻害実験は以下の方法で行った。反応溶液 (50mM Tris-HCl (pH8.0), 5mM EDTA, 150mM NaCl, 0.1% NP-40, プロテアーゼインヒビターとして1mM PMSF, 50 μ g/ml Leupeptin, 1mM Benzamidine, 7 μ g/ml Pepstatin) 50 μ l中に固相化したGST-Fas (2~6 μ M) または固相化していないGST-Fas (2~6 μ M)、被検物質、および [35 S] PTP-BASフラグメント1を混合し、4 $^{\circ}$ Cで12~16時間インキュベーションした。固相化したGST-Fasを用いた場合、反応後遠心操作によりGlutathione Sepharose 4Bを洗浄し、SDSサンプルバッファーに懸濁してSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。ゲルを乾燥後、オートラジオグラフをとり、GST-Fasに結合していた [35 S] PTP-BASフラグメント1のバンドの濃淡より被検物質によるFasとPTP-BASの結合阻害を測定した。固相化していないGST-Fasを用いた場合は、インキュベーション後Glutathione Sepharose 4Bを加え、さらに4 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベーションし、GST-Fas-[35 S] PTP-BASフラグメント1複合体とGlutathione Sepharose 4Bとを結合させた。遠心操作によりGlutathione Sepharose 4Bを洗浄したあと液体シンチレーターを加え、液体シンチレーションカウンターで [35 S] PTP-BASフラグメント1の放射活性を測定した。反応液中にGST-Fasを加えていないものをブランク値とし、測定値より差し引いた。コントロール (被検物質非存在下) の放射活性に対する被検物質存在下での放射活性を求め、結合阻害曲線を描き、結合を50%阻害する被検物質の濃度をIC₅₀とした。

第2表 インビトロでのFas と PTP-BASの結合阻害

被検物質	阻害活性 (IC ₅₀)
SLV	250 μ M
Ac-RNEIQSLV	23 μ M
Ac-QSLV	102 μ M
Ac-SLV	47 μ M
Ph-NHCO-SLV	9 μ M
Cyh-NHCO-SLV	38 μ M
Ph-NHCO-SLV-OMe	>1000 μ M*
Cyh-NHCO-SLV-OMe	>1000 μ M**
Ac-SEV	500 μ M
Ac-TLV	62 μ M

* 1 mMで40%阻害, ** 1 mMで20%阻害

上記結果により、本発明のペプチド及びペプチド誘導体がインビトロでFasとPTP-BASの結合を阻害することが示された。

実施例31

大腸癌株への細胞死の各種ペプチドによる誘導 (その1)

PTP-BASの発現が確認されているヒト大腸癌HT-29細胞およびDLD-1細胞を用いた。96穴平底プレート(Nunc社)を用いて、 2×10^4 個のHT-29細胞もしくはDLD-1細胞を100 μ lの培養液(10%FCSを含むRPMI 1640メディウム、日水製薬社)中で24時間、37℃、5%炭酸ガス条件下で培養し、各濃度の抗Fas抗体(CH-11、MBL社)もしくは培養液(コントロール)10 μ l、および10 mMに調製したFasとPTP-BASとの結合阻害剤(Ph-NHCO-SLV-OMeのみ

1 mM) もしくはその溶媒 (コントロール) 10 μ l を添加してさらに20時間培養した。培養上清を除去後、付着した細胞をリン酸緩衝生理食塩水で数回洗浄し、上記培養液90 μ l とMTT液 (ケミコンインターナショナル社) 10 μ l を加え、4時間培養した。100 μ l の0.04N HClを含むイソプロパノールを加えたのちに、マイクロプレートリーダーにより570 nmの吸光度を測定した。コントロール (CH-11非存在下で培養したとき) の吸光度に対するCH-11存在下で培養したときの吸光度を求め、百分率で表示した。

第3表 FasとPTP-BASの結合阻害剤存在下での腫瘍細胞に対する抗Fas抗体の抗腫瘍作用

Fas/PTP-BAS 結合阻害剤	腫瘍	抗Fas抗体 CH-11 (ng/ml)							
		30		100		300		1000	
		阻害剤- 阻害剤+	阻害剤- 阻害剤+	阻害剤- 阻害剤+	阻害剤- 阻害剤+	阻害剤- 阻害剤+	阻害剤- 阻害剤+	阻害剤- 阻害剤+	阻害剤- 阻害剤+
Ac-SLV-OMe	HT-29	93	112	90	99	82	65	72	78
	HT-29	99	99	95	90	90	77	82	61
Cyh-NHCO-SLV	DLD-1	92	95	85	88	84	80	74	74
	HT-29	105	91	99	78	98	63	92	54
Cyh-NHCO-SLV-OMe	DLD-1	98	60	90	43	86	26	76	24
	HT-29	104	89	89	75	81	65	73	55
Ph-NHCO-SLV	DLD-1	100	91	102	88	85	86	78	75
	HT-29	97	100	94	92	86	83	72	64
Ph-NHCO-SLV-OMe*	DLD-1	95	93	88	94	81	80	75	63

* 本阻害剤のみの阻害剤の1/10濃度で実施した。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

上記結果により、本発明のペプチド誘導体が抗Fas抗体に対する癌細胞の感受性を高め、癌細胞に細胞死を誘導することが示された。

実施例 3 2

15アミノ酸ペプチドによるFas／PTP-BAS結合阻害

実施例30の方法を用い、FasのC末端15アミノ酸ペプチドによるFas／PTP-BAS結合阻害を求めた。ただし、ブランク値は、PTP-BASと結合しないことが知られているGST-Fas（アミノ酸191-320）を用いたときの値とした。陰性対照として、ヒト

Proadrenomedullin N-Terminal 20
Peptide (hPAMP)（配列：

ARLDVASEFRKKWNKWALSR-NH₂）を用いた。

図1にFasのC末端15アミノ酸ペプチドによるインビトロのFas／PTP-BAS結合阻害を示す。オートラジオグラフのバンドが薄くなるほど、阻害活性が高いことを示している。FasのC末端15アミノ酸ペプチド（Ac-DSENSNFRNEIQSLV）は、インビトロのFas／PTP-BAS結合を濃度依存的に阻害した。陰性対照のhPAMPは、1mMにおいてもFas／PTP-BASの結合を全く阻害しなかった。

実施例 3 3

ペプチド鎖長とFas／PTP-BAS結合阻害活性の関係

実施例32の方法を用い、FasのC末端から1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 15個のアミノ酸残基からなる、N末端をアセチル化したペプチドのFas／PTP-BAS結合阻害活性を求めた。

図2にFas／PTP-BASの結合におよぼす長さの異なるFasのC末端ペプチドの影響を示す。グラフに示すとおり、15～6個のアミノ酸鎖長ペプチドのFas／PTP-BAS結合阻害活性は同程度であった。5～3個のアミノ

THIS PAGE BLANK (USPTO)

酸ペプチドは、10, 100 μ Mにおいて15~6個のアミノ酸ペプチドよりも Fas/PTP-BAS 結合阻害活性は弱かった。2個のアミノ酸、1個のアミノ酸ペプチドは Fas/PTP-BAS 結合をほとんど阻害しなかった。これらの結果から、Fas/PTP-BAS の結合阻害には最短3個のアミノ酸ペプチド (Ac-SLV) が必要であると考えられた。

実施例 34

トリペプチドスキニングによるインビトロ結合阻害活性の変化

実施例 32 の方法に従い、Ac-SLV のそれぞれのアミノ酸を他の L-アミノ酸に置き換え、スキニングしたトリペプチドのインビトロ Fas/PTP-BAS 結合阻害活性を検討した。

図3に1mMのペプチド存在下、図4に0.1mMペプチド存在下における Fas/PTP-BAS 結合阻害を示す。また、図5にAc-SLVとAc-TLVの Fas/PTP-BAS 結合阻害の濃度依存性曲線を示す。図3 (左) に示すとおり、Sに対してスキニングした1mMのペプチド存在下において、TはSと同程度の強い阻害活性を示した。図3 (中央) に示すとおり、Lの位置は、1mMペプチド存在下においてほとんど全てのアミノ酸と置換してもLと同程度の強い阻害活性を示した。図3 (右) に示すとおり、Vの位置は、Iが強い阻害活性を持っていたが、その他のアミノ酸に置換したものは概してほとんど阻害活性を示さなかった。図4に示したように、Lをスキニングした0.1mMペプチド存在下では、RがLと同程度の強さであった。図5に示したとおり、Fas/PTP-BAS 結合阻害の濃度依存性曲線は、ほぼ同じ形状の曲線が描かれていることから、Ac-SLVとAc-TLVとはFas/PTP-BAS の結合を同程度に阻害することがわかった。これら図3, 4及び5の結果より、Ac-SLVのSの位置はSまたはTが、Lの位置はL-アミノ酸あるいはグリシン、特にLまたはRが、Vの位置はVまたはIが、それぞれインビトロでの

Fas/PTP-BASの結合阻害に重要であることがわかった。

実施例35

D体、Nメチル体、還元体のインビトロ結合阻害活性

実施例32の方法に従い、1mMのAc-SLVのD体、Nメチル体、還元体のインビトロFas/PTP-BAS結合阻害活性を検討した。

図6にD体、Nメチル体、還元体のインビトロ結合阻害活性を示す。これらの実験は、1mMのペプチド存在下で行った。Ac-SLVのSを(D)Sに置換しても、弱くはなるものの阻害活性は保持していた。Nメチル体、還元体も、Ac-SLVよりも阻害活性は弱くなるものの、活性は保持していた。

実施例36

N末修飾によるインビトロ結合阻害活性の上昇

実施例32の方法に従い、Ac-SLVのN末端修飾体のインビトロFas/PTP-BAS結合阻害活性を検討した。

図7にN末修飾によるインビトロ結合阻害活性を示す。(N末端の修飾は、白丸がアセチル、黒三角がフェニルウレイド、白三角がシクロヘキシルウレイド、白四角が非修飾である)SLVのN末端修飾体はインビトロの結合阻害活性を上昇させた。その順番は、フェニルウレイド体>シクロヘキシルウレイド体>アセチル体であった。

実施例37

インビトロ結合阻害活性へのC末修飾の影響

実施例32の方法に従い、C末端修飾体のインビトロFas/PTP-BAS結合阻害活性を検討した。結果を図8に示した。

1mMのPh-NHCO-SLV-OMe, Cyh-NHCO-SLV-OMeは、Ac-SLVよりも活性は弱くなるものの、インビトロ結合阻害活性を保持していた

実施例38

Ac-SLVのマイクロインジェクションによる大腸癌株への細胞死の誘導

直径35mmのプラスチックシャーレ中にマイクログリッドカバースリップ(セロケイト、エッペンドルフ社)を固定し、このシャーレ中で2mlの培養液(10%FCSを含むRPMI1640メディウム、日水製薬社)を用いて 4×10^5 個のヒト大腸癌細胞DLD-1を24時間、37℃、5%炭酸ガスの条件下で培養した。マイクログリッドカバースリップに接着した細胞に、マイクロニューピュレータ(エッペンドルフ社)、マイクロインジェクター(エッペンドルフ社)、およびガラス針(フェムトチップ、エッペンドルフ社)を用い、注入圧力50hPa、注入時間0.1秒の条件でK-PBS中で0.01mMに調製したAc-SLVもしくはコントロールとしてK-PBSのみをそれぞれ20から30個の細胞に注入した。なお、抗Fas抗体(CH-11)処理細胞では、マイクロインジェクション直前に100ng/mlのCH-11をシャーレに添加した。マイクロインジェクションの3時間後に写真撮影した。

図9に示すとおり、癌細胞内に注入されたAc-SLVが抗Fas抗体に対する癌細胞の感受性を高め、癌細胞に細胞死を誘導することが示された。

実施例39

大腸癌株への細胞死の各種ペプチドによる誘導(その2)

実施例31の方法に従ってヒト大腸癌DLD-1に対するFas/PTP-BAS結合阻害剤の細胞死誘導作用を調べた。ただし一部の試験では前培養時間を72時間とし、また、添加するFas/PTP-BAS結合阻害の濃度を2.5mMから10mMとした。マイクロプレートリーダーにより570nmの吸光度を測定し、その値をもって生細胞数の指標とした。

図10に示すとおり、Cyh-NHCO-SLV-OMe、Cyh-NHCO-SLV-OEt、Ph-NHCO-SLV-OMe、Ph-NHCO-SLV

- O E t が抗 F a s 抗体に対する癌細胞の感受性を高め、癌細胞に細胞死を誘導することが示された。

実施例 40

大腸癌株への細胞死の各種ペプチドによる誘導（その3）

実施例 31 の方法に従ってヒト大腸癌 D L D - 1 に対する P h - N H C O - S L V - O E t の細胞死誘導作用を調べた。ただし前培養時間を 72 時間とした。また添加する P h - N H C O - S L V - O E t の濃度を 2.5 mM とした。抗 F a s 抗体 (C H - 11) もしくは培養液および P h - N H C O - S L V - O E t もしくはその溶媒を添加し、20 時間後に、倒立顕微鏡下で写真撮影した。

図 11 に示すとおり、P h - N H C O - S L V - O E t は C H - 11 存在下で、D L D - 1 に顕著な細胞死 (アポトーシス) を誘導した。

実施例 41

S L V 誘導体による V I P 誘導気管支収縮の抑制（その1）

モルモット気管支標本の作製は A k e a s u の方法に準じて行った (A k e a s u, J. P h a r m a. P h a r m a c o l. 4 巻, 671 ページ, 1952 年)。モルモットの頸部および筋肉を正中線に沿って切開し、口喉頭蓋軟骨下端より胸部に至るまでの頸部気管を取り出して、T y r o d e - H e p e s 栄養液中に浸した。十分に栄養液で濡らしたろ紙をシャーレ内にしき、その上で外膜の疎性結合組織を取り除いた後、軟骨をつけたまま幅 2 ~ 3 mm のリングとし、それぞれ 3 個、互いに連結した。筋の対側の軟骨をハサミで切り開き標本とし、37℃、C O₂ 5%、O₂ 95% の条件下の M a g n u s 装置内につるした。

V I P は累積法にて投与した。P h - N H C O - S L V - O E t などの薬剤は 15 分間前処置後その存在下で V I P を投与した。実験の間隔は 5 分間とし、その間 T y r o d e - H e p e s 液で 2 ~ 3 回洗浄を行った。

図12に示すとおり、VIPは気管平滑筋を 10^{-8} Mより濃度依存的に弛緩させ 3×10^{-6} で最大反応を示した。ヒトVIPレセプターのC末端配列-S-L-Vを基に合成されたペプチド誘導体であるPh-NHCO-SLV-OEtはVIPによる気管平滑筋の弛緩反応を 1×10^{-7} M $\sim 1 \times 10^{-4}$ Mの範囲で濃度に依存して抑制し、 1×10^{-5} M以上で顕著な抑制効果を示した。

一方、図13、14に示すとおり、C末端のVをAやLに置換したペプチド誘導体Ph-NHCO-SLA-OEt (図13)、Ph-NHCO-SLL-OEt (図14)は 1×10^{-7} M $\sim 1 \times 10^{-4}$ Mの濃度でVIPによる弛緩反応をわずかに抑制した。

また、図15に示すとおり、細胞内に取り込ませるためのC末端の修飾を施していないペプチド誘導体Ph-NHCO-SLV-OHはVIPの弛緩反応を殆ど抑制しなかった。

実施例42

SLL誘導体によるイソプロテレノール誘導気管支収縮の抑制

Isoproterenol (Iso)は β_2 -アドレナジックレセプターに作用して気管支の弛緩を誘導する。VIPの代わりにIsoを用い実施例41と同様の方法で化合物の弛緩抑制効果を測定した。

図16に示すとおり、Isoは気管平滑筋を 10^{-8} Mより濃度依存的に弛緩させ 3×10^{-6} で最大反応を示した。ヒト β_2 -アドレナジックレセプターのC末端配列-S-L-Lを基に合成されたペプチド誘導体であるPh-NHCO-SLL-OEtはIsoによる気管平滑筋の弛緩反応を 1×10^{-7} M $\sim 1 \times 10^{-4}$ Mの範囲で濃度に依存して抑制し、 1×10^{-5} M以上で顕著な抑制効果を示した。

一方、図17、18に示すとおり、C末端のLをAやVに置換したペプチド誘導体Ph-NHCO-SLA-OEt (図17)、Ph-NHCO-SLV-

OE t (図18) は $1 \times 10^{-7} \text{M} \sim 1 \times 10^{-4} \text{M}$ の濃度でVIPによる弛緩反応をわずかに抑制した。

実施例43

TTL誘導体によるIL-8誘導細胞内Ca取り込みの抑制

IL-8レセプターの機能に対する本発明化合物の影響を調べるため、ヒトIL-8レセプターの遺伝子を高発現している細胞株を樹立した。具体的には、HEK293細胞にhIL-8 receptor (hIL-8BR) のcDNAをpEFneoを用いて導入し、hIL-8BRが安定高発現する細胞を得た。この細胞はhIL-8を適応すると細胞内 Ca^{2+} の大きな上昇が観察されたが、pEFneoのみを導入した細胞はhIL-8を添加しても細胞内 Ca^{2+} は極僅かな上昇がみられたのみであった。次に細胞をDMEM, 10% FCS, 1%ペニシリン-ストレプトマイシン (GIBCO-BRL 社製), G418 $600 \mu\text{g/ml}$ 中で260ml容のフラスコ中で培養し、ほぼconfluentになったところで実験に供した。培地を吸引した後5mlPBSで洗浄し、 $5 \mu\text{M}$ Fura2-AM (HEPES buffer) にて30分インキュベーションした。PBS 5mlで洗浄し、トリプシン処理の後8.5mlのHEPES bufferを加えて遠心 ($1000 \text{rpm} \times 3 \text{min}$) し、上清を除いた。得られた細胞に5mlの $5 \mu\text{M}$ Fura2-AM (HEPES buffer) を加え再びサスペンションしエッペンチューブ (1.5ml) に1mlずつ分注した。ここにHEPES bufferに溶解したサンプル化合物 (1% DMSO) を添加 ($10 \mu\text{l}$) し、 37°C で更に30分インキュベーションした。その後遠心 ($1000 \text{rpm} \times 3 \text{min}$) して上清を除きHEPES buffer 1mlを加え再びサスペンションした。ここに再びHEPES bufferに溶解したサンプル化合物 (1% DMSO) を添加 ($10 \mu\text{l}$) し、5-10分室温に放置し、細胞内 Ca^{2+} の測定を行った。

細胞内 Ca^{2+} の測定には日本分光社CAF-100を用いた。上記で調製した、細胞の浮遊液1mlを小型のスターバーを入れたキューベットに入れ、液を攪拌しながら37℃に保温して測定を行った。380, 340nmで励起したときの510nm蛍光を測定し、340nmで励起したときの値を、380nmで励起したときの値で割ったものを相対的な Ca^{2+} の変化とした。細胞浮遊液を装置にセットしてからベースの値が落ち着くのを待ってhIL-8 (免疫生物研究所より購入) 100nMを10μlキューベットないにマイクロシリンジを用いて添加して1分程度観察した。観察終了後10% Triton X100を10μl 添加し、そのときの値と更にその後3M EGTAを15μl 加えた時の値を用いて細胞内 Ca^{2+} の絶対値を計算により求めた。得られた結果を次表に示す。

第4表

化合物濃度* (M)	細胞内 Ca^{2+} (nM)	阻害率 (%)
0	177	—
10^{-8}	155	12.4
10^{-7}	79	55.4

*化合物はPh-NHCO-TTL-OEtを使用

ヒトIL-8レセプターのC末端配列をもとにデザインされたPh-NHCO-TTL-OEtは、ヒトIL-8レセプター遺伝子トランスフェクタントのIL-8による細胞内 Ca^{2+} 取込みを阻害した。

実施例44

SLV誘導体のVIP誘導気管支収縮の抑制 (その2)

モルモットの気管支の代わりにラット気管支を用い実施例41と同様の方法でVIP誘導気管支弛緩の化合物による抑制効果を測定した

Ph-NHCO-SLV-OEtで15分間前処置後その存在下でVIPを投与した。実験の間隔は5分間とし、そのTyrode-Hepes液で2~3回洗浄を行った。

結果を次表に示す。

第5表

化合物濃度 (M)	弛緩 (%)
0	100
10^{-6}	62
10^{-5}	12
10^{-4}	14

VIPは 10^{-6} Mの濃度でラット気管平滑筋を弛緩させた。ラットVIPレセプターのC末端配列-S-L-Vを基に合成されたペプチド誘導体であるPh-NHCO-SLV-OEtはVIPによるラット気管平滑筋の弛緩反応を 1×10^{-6} M~ 1×10^{-4} Mの範囲で顕著に抑制した。

実施例45

N-(2-アミノフェニル) アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((2-NH₂) Ph-NHCO-SLV) の調製

実施例23と同様にして、O- α -ブチル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン- α -ブチルエステルと2-ニトロフェニルイソシアネートを反応させN-(2-ニトロフェニル) アミノカルボニル-O- α -ブチル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン- α -ブチルエステルを得た。

これを、エタノール中、水酸化パラジウムの存在下接触還元し、N-(2-アミノフェニル) アミノカルボニル-O- α -ブチル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン- α -ブチルエステルにした後、さらにTFAで処理することによ

って目的とするN-(2-アミノフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((2-NH₂)Ph-NHCO-SLV))を得た。

FAB-MS (m/z) : 452 (MH⁺)。

¹H-NMR (δ, CD₃OD) : 0.93 (12H, m)、1.65 (3H, m)、2.15 (1H, m)、3.77 (1H, dd, J=11.0, 7.7Hz)、3.86 (1H, dd, J=11.0, 7.5Hz)、4.29 (1H, m)、4.37 (1H, m)、4.53 (1H, m)、7.15-7.3 (4H, m)。

実施例46

N-(3-アミノフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((3-NH₂)Ph-NHCO-SLV)の調製

実施例45の2-ニトロフェニルイソシアネートの代わりに、3-ニトロフェニルイソシアネートを用い、同様に処理することによって目的とするN-(3-アミノフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((3-NH₂)Ph-NHCO-SLV))を得た。

FAB-MS (m/z) : 452 (MH⁺)。

¹H-NMR (δ, CD₃OD) : 0.95 (12H, m)、1.65 (3H, m)、2.15 (1H, m)、3.74 (1H, dd, J=11.0, 6.1Hz)、3.87 (1H, dd, J=11.0, 5.5Hz)、4.29 (1H, dd, J=6.1, 5.5Hz)、4.40 (1H, t, J=5.5Hz)、4.52 (1H, m)、6.88 (1H, d, J=7.9Hz)、7.14 (1H, d, J=8.5Hz)、7.34 (1H, dd, J=7.9Hz)、7.69 (1H, s)。

実施例47

N-(4-アミノフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-

L-バリン ((4-NH₂) Ph-NHCO-SLV) の調製

実施例45の2-ニトロフェニルイソシアネートとの代わりに、4-ニトロフェニルイソシアネートを用い、同様に処理することによって目的とするN-(4-アミノフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((4-NH₂)Ph-NHCO-SLV))を得た。

FAB-MS (m/z) : 452 (MH^+)_o

$^1\text{H-NMR}$ (δ , CD_3OD) : 0.95 (12H, m)、1.65 (3H, m)、2.15 (1H, m)、3.74 (1H, dd, $J=10.4$, 6.1Hz)、3.86 (1H, dd, $J=10.4$, 5.5Hz)、4.29 (1H, dd, $J=6.1$, 5.5Hz)、4.38 (1H, t, $J=5.5\text{Hz}$)、4.52 (1H, m)、7.23 (2H, d, $J=9.2\text{Hz}$)、7.51 (2H, d, $J=8.6\text{Hz}$)。

实施例 48

N-(2-(L-グルタミルアミノ)フェニル)アミノカルボニル-L-セリ
ル-L-ロイシル-L-バリン(2-(Glu-NH)Ph-NHCO-SLV)
の調製

実施例 45 で得られた N- (2-アミノフェニル) アミノカルボニル-O-t-
ブチル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン-t-ブチルエステルと N-
Boc-L-グルタミン酸-γ-t-ブチルエステルを実施例 22 と同様に縮合
した後、TFA で処理することにより目的とする N- (2- (L-グルタミルア
ミノ) フェニル) アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン
(2- (Glu-NH) Ph-NHCO-SLV) を得た。

FAB-MS (m/z) : 581 (MH^+) .

$$^1\text{H-NMR} (\delta, \text{CD}_3\text{OD}) : 0.93 (12\text{H}, \text{m}), 1.65 (3\text{H}, \text{m}), 2.15 (1\text{H}, \text{m}), 2.25 (2\text{H}, \text{m}), 2.57 (2\text{H}, \text{m}),$$

3. 79 (1H, dd, $J=10.4, 6.1$ Hz)、3. 88 (1H, dd, $J=10.4, 5.5$ Hz)、4. 19 (1H, t, $J=6$ Hz)、4. 27 (1H, t, $J=5.5$ Hz)、4. 38 (1H, t, $J=5.5$ Hz)、4. 50 (1H, dd, $J=10.5$ Hz)、7. 22 (2H, m)、7. 38 (1H, m)、7. 61 (1H, m)。

実施例 49

N-(3-(L-グルタミルアミノ)フェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(3-(Glu-NH)Ph-NHCO-SLV)

の調製

実施例 46 で中間体として得られた N-(3-アミノフェニル)アミノカルボニル-O-t-ブチル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン-t-ブチルエステルを実施例 48 と同様に N-Boc-L-グルタミン酸-γ-t-ブチルエステルと反応させ、目的とする N-(3-(L-グルタミルアミノ)フェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(3-(Glu-NH)Ph-NHCO-SLV)を得た。

FAB-MS (m/z) : 581 (MH^+)。

1H -NMR (δ , CD_3OD) : 0. 94 (12H, m)、1. 65 (3H, m)、2. 18 (3H, m)、2. 52 (2H, m)、3. 71 (1H, dd, $J=10.4, 6.1$ Hz)、3. 86 (1H, dd, $J=10.4, 5.5$ Hz)、4. 02 (1H, t, $J=6$ Hz)、4. 28 (1H, m)、4. 39 (1H, t, $J=5.5$ Hz)、4. 52 (1H, dd, $J=10.5$ Hz)、7. 08 (1H, d, $J=8$ Hz)、7. 23 (2H, m)、7. 78 (1H, s)。

実施例 50

N-(4-(L-グルタミルアミノ)フェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(3-(Glu-NH)Ph-NHCO-SLV)

ル-L-ロイシル-L-バリン (4-(Glu-NH) Ph-NHCO-SLV)

の調製

実施例47で中間体として得られたN-(4-アミノフェニル)アミノカルボニル-O-t-ブチル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン-t-ブチルエステルを実施例48と同様に処理することにより目的とするN-(4-(L-グルタミルアミノ)フェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(4-(Glu-NH) Ph-NHCO-SLV)を得た。

FAB-MS (m/z) : 581 (MH⁺)。

¹H-NMR (δ, CD₃ OD) : 0.95 (12H, m)、1.55-1.8 (3H, m)、2.20 (3H, m)、2.53 (2H, m)、3.73 (1H, dd, J=10.4, 6.1 Hz)、3.86 (1H, dd, J=10.4, 5.5 Hz)、4.01 (1H, t, J=6.1 Hz)、4.28 (1H, d, J=6.1 Hz)、4.38 (1H, t, J=5.5 Hz)、4.52 (1H, dd, J=9.8, 4.9 Hz)、7.36 (2H, d, J=8.5 Hz)、7.48 (2H, d, J=8.5 Hz)。

実施例51

N-(2-(N-アセチル-L-グルタミルアミノ)フェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(2-(AcGlu-NH) Ph-NHCO-SLV)の調製

実施例48のN-Boc-L-グルタミン酸-γ-t-ブチルエステルの代わりにN-Ac-L-グルタミン酸-γ-t-ブチルエステルを用い、同様に処理することにより目的とするN-(2-(N-アセチル-L-グルタミルアミノ)フェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(2-(AcGlu-NH) Ph-NHCO-SLV)を得た。

FAB-MS (m/z) : 623 (MH⁺)。

$^1\text{H-NMR}$ (δ , CD_3OD) : 0.92 (12H, m)、1.6–1.8 (3H, m)、2.07 (3H, s)、2.05–2.20 (3H, m)、2.51 (2H, m)、3.76 (1H, dd, $J=11.0, 5.5\text{Hz}$)、3.88 (1H, dd, $J=11.0, 5.5\text{Hz}$)、4.25 (1H, t, $J=6.1\text{Hz}$)、4.35 (2H, m)、4.53 (1H, dd, $J=10.4, 4.9\text{Hz}$)、7.06 (1H, dd, $J=6.7, 7.9\text{Hz}$)、7.21 (1H, dd, $J=6.7, 7.3\text{Hz}$)、7.31 (1H, d, $J=7.9\text{Hz}$)、7.79 (1H, d, $J=7.3\text{Hz}$)。

実施例52

N-(3-(N-アセチル-L-グルタミルアミノ)フェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(3-(AcGlu-NH)Ph-NHCO-SLV)の調製

実施例49のN-Boc-L-グルタミン酸- γ -t-ブチルエステルの代わりにN-Ac-L-グルタミン酸- γ -t-ブチルエステルを用い、同様に処理することにより目的とするN-(3-(N-アセチル-L-グルタミルアミノ)フェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(3-(AcGlu-NH)Ph-NHCO-SLV)を得た。

FAB-MS (m/z) : 623 (MH^+)。

$^1\text{H-NMR}$ (δ , CD_3OD) : 0.95 (12H, m)、1.6–1.8 (3H, m)、2.0 (1H, m)、2.01 (3H, s)、2.15 (2H, m)、2.42 (2H, t, $J=7.3\text{Hz}$)、3.73 (1H, dd, $J=10.4, 5.5\text{Hz}$)、3.85 (1H, dd, $J=10.4, 5.5\text{Hz}$)、4.28 (1H, m)、4.39 (1H, t, $J=5.5\text{Hz}$)、4.50 (2H, m)、7.18 (3H, m)、7.64 (1H, s)。

実施例 5 3

N-(4-(N-アセチル-L-グルタミルアミノ)フェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(4-(AcGlu-NH)Ph-NHCO-SLV)の調製

実施例50のN-Boc-L-グルタミン酸-γ-t-ブチルエステルの代わりにN-Ac-L-グルタミン酸-γ-t-ブチルエステルを用い、同様に処理することにより目的とするN-(4-(N-アセチル-L-グルタミルアミノ)フェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(4-(AcGlu-NH)Ph-NHCO-SLV)を得た。

FAB-MS (m/z) : 623 (MH⁺)。

¹H-NMR (δ, CD₃OD) : 0.95 (12H, m)、1.6-1.8 (3H, m)、2.0 (1H, m)、2.01 (3H, s)、2.15 (2H, m)、2.42 (2H, t, J=7.3Hz)、3.73 (1H, dd, J=11.0, 5.5Hz)、3.85 (1H, dd, J=11.0, 5.5Hz)、4.27 (1H, d, J=6.1Hz)、4.37 (1H, t, J=5.5Hz)、4.47 (1H, dd, J=8.5, 5.5Hz)、4.52 (1H, dd, J=9.8, 5.5Hz)、7.32 (2H, d, J=9.2Hz)、7.44 (2H, d, J=9.2Hz)。

実施例 5 4

N-(4-メトキシフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((4-MeO)Ph-NHCO-SLV)の調製

実施例1と同様に固相上合成したペプチドを4-メトキシフェニルイソシアネートを用い、実施例5と同様に処理し、目的とするN-(4-メトキシフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((4-MeO)Ph-NHCO-SLV)を得た。

FAB-MS (m/z) : 467 (MH^+)。

1H -NMR (δ , CD_3OD) : 0.95 (12H, m)、1.6-1.8 (3H, m)、2.15 (1H, m)、3.72 (1H, dd, $J=10.4$, 6.1 Hz)、3.75 (3H, s)、3.84 (1H, dd, $J=10.4$, 5.5 Hz)、4.28 (1H, d, $J=5.5$ Hz)、4.37 (1H, t, $J=5.5$ Hz)、4.51 (1H, dd, $J=9.8$, 4.9 Hz)、6.83 (2H, d, $J=8.6$ Hz)、7.24 (2H, d, $J=8.6$ Hz)。

実施例 55

N-ベンジルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (Bn-NHCO-SLV) の調製

ベンジルイソシアネートを用い、実施例54と同様に反応を行ない、N-ベンジルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (Bn-NHCO-SLV) を得た。

FAB-MS (m/z) : 451 (MH^+)。

1H -NMR (δ , CD_3OD) : 0.94 (12H, m)、1.6-1.8 (3H, m)、2.15 (1H, m)、3.68 (1H, dd, $J=10.4$, 6.1 Hz)、3.80 (1H, dd, $J=10.4$, 5.5 Hz)、4.28 (1H, d, $J=5.5$ Hz)、4.31 (2H, s)、4.34 (1H, t, $J=5.5$ Hz)、4.50 (1H, dd, $J=10.4$, 4.9 Hz)、7.21 (1H, m)、7.28 (4H, m)。

実施例 56

N-(4-アセチルフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (4-Ac)Ph-NHCO-SLV) の調製

4-アセチルフェニルイソシアネートを用い、実施例54と同様に反応を行な

い、N-(4-アセチルフェニル) アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン ((4-Ac) Ph-NHCO-SLV) を得た。

FAB-MS (m/z) : 479 (MH^+)。

1H -NMR (δ , CD_3OD) : 0.95 (12H, m)、1.6-1.8 (3H, m)、2.16 (1H, m)、2.54 (3H, s)、3.74 (1H, dd, $J=10.4, 6.1Hz$)、3.87 (1H, dd, $J=10.4, 5.5Hz$)、4.29 (1H, d, $J=5.5Hz$)、4.40 (1H, t, $J=5.5Hz$)、4.52 (1H, m)、7.51 (2H, d, $J=8.6Hz$)、7.91 (2H, d, $J=8.6Hz$)。

実施例57

N-(4-フェノキシフェニル) アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン ((4-PhO) Ph-NHCO-SLV) の調製

4-フェノキシフェニルイソシアネートを用い、実施例54と同様に反応を行ない、N-(4-フェノキシフェニル) アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン ((4-PhO) Ph-NHCO-SLV) を得た。

FAB-MS (m/z) : 479 (MH^+)。

1H -NMR (δ , CD_3OD) : 0.94 (12H, m)、1.6-1.8 (3H, m)、2.15 (1H, m)、3.74 (1H, dd, $J=10.4, 6.1Hz$)、3.86 (1H, dd, $J=10.4, 5.5Hz$)、4.26 (1H, d, $J=5.5Hz$)、4.38 (1H, t, $J=5.5Hz$)、4.51 (1H, dd, $J=10.4, 4.9Hz$)、6.92 (4H, m)、7.05 (1H, t, $J=7.3Hz$)、7.31 (2H, t, $J=8.5Hz$)、7.35 (2H, d, $J=9.2Hz$)。

実施例58

N-(5-エトキシカルボニルペンチル) アミノカルボニル-L-セリル-L

—ロイシル—L—バリン (EtOCO(CH₂)₅—NHCO—SLV) の調製
4—アセチルフェニルイソシアネートを用い、実施例54と同様に反応を行ない、N—(5—エトキシカルボニルペンチル) アミノカルボニル—L—セリル—L—ロイシル—L—バリン (EtOCO(CH₂)₅—NHCO—SLV) を得た。

FAB-MS (m/z) : 503 (MH⁺)。

¹H-NMR (δ, CD₃OD) : 0.94 (12H, m)、1.24 (3H, t, J=7.3Hz)、1.35 (2H, m)、1.48 (2H, m)、1.55—1.75 (5H, m)、2.15 (1H, m)、2.31 (2H, t, J=7.3Hz)、3.11 (2H, t, J=7.3Hz)、3.66 (1H, dd, J=10.4, 6.1Hz)、3.78 (1H, dd, J=10.4, 5.5Hz)、4.10 (2H, q)、4.30 (2H, m)、4.49 (1H, dd, J=9.8, 4.9Hz)。

実施例59

N—ベンゾイルアミノカルボニル—L—セリル—L—ロイシル—L—バリン (PhCO—NHCO—SLV) の調製

ベンゾイルイソシアネートを用い、実施例54と同様に反応を行ない、N—ベンゾイルアミノカルボニル—L—セリル—L—ロイシル—L—バリン (PhCO—NHCO—SLV) を得た。

FAB-MS (m/z) : 451 (MH⁺)。

¹H-NMR (δ, CD₃OD) : 0.95 (12H, m)、1.6—1.8 (3H, m)、2.17 (1H, m)、3.80 (1H, dd, J=11.0, 5.5Hz)、3.92 (1H, dd, J=11.0, 4.9Hz)、4.29 (1H, d, J=5.5Hz)、4.52 (2H, m)、7.51 (2H, t, J=7.9Hz)、7.62 (1H, t, J=7.3Hz)、7.92 (2H,

d, $J = 7.3 \text{ Hz}$)。

実施例 60

N-(3-ニトロフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((3-NO₂)Ph-NHCO-SLV)の調製

3-ニトロフェニルイソシアネートを用い、実施例54と同様に反応を行ない、N-(3-ニトロフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((3-NO₂)Ph-NHCO-SLV)を得た。

FAB-MS (m/z) : 482 (MH^+)。

¹H-NMR (δ , CD₃OD) : 0.95 (12H, m)、1.6-1.8 (3H, m)、2.16 (1H, m)、3.76 (1H, dd, $J = 10.9, 5.5 \text{ Hz}$)、3.87 (1H, dd, $J = 10.9, 5.5 \text{ Hz}$)、4.29 (1H, d, $J = 5.5 \text{ Hz}$)、4.40 (1H, t, $J = 5.5 \text{ Hz}$)、4.53 (1H, dd, $J = 9.8, 5.5 \text{ Hz}$)、7.47 (1H, t, $J = 7.9 \text{ Hz}$)、7.62 (1H, dd, $J = 7.9, 1.8 \text{ Hz}$)、7.82 (1H, dd, $J = 7.9, 1.8 \text{ Hz}$)、8.46 (1H, t, $J = 1.8 \text{ Hz}$)。

実施例 61

N-(2-ニトロフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((2-NO₂)Ph-NHCO-SLV)の調製

2-ニトロフェニルイソシアネートを用い、実施例54と同様に反応を行ない、N-(2-ニトロフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((2-NO₂)Ph-NHCO-SLV)を得た。

FAB-MS (m/z) : 482 (MH^+)。

¹H-NMR (δ , CD₃OD) : 0.95 (12H, m)、1.6-1.8 (3H, m)、2.15 (1H, m)、3.79 (1H, dd, $J = 10.4,$

6. 1 Hz)、3. 84 (1H, dd, J=10. 4, 6. 1 Hz)、4. 28 (1H, d, J=5. 5 Hz)、4. 39 (1H, t, J=6. 1 Hz)、4. 52 (1H, dd, J=9. 8, 5. 5 Hz)、7. 14 (1H, ddd, J=8. 5, 1. 2, 1. 2 Hz)、7. 60 (1H, ddd, J=8. 5, 1. 2, 1. 2 Hz)、8. 12 (1H, dd, J=8. 5, 1. 2 Hz)、8. 33 (1H, dd, J=8. 5, 1. 2 Hz)。

実施例 6 2

N-(4-ブロモフェニル) アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン ((4-Br) Ph-NHCO-SLV) の調製

4-ブロモフェニルイソシアネートを用い、実施例 5 4 と同様に反応を行ない、N-(4-ブロモフェニル) アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン ((4-Br) Ph-NHCO-SLV) を得た。

FAB-MS (m/z) : 515 (MH⁺)。

¹H-NMR (δ, CD₃ OD) : 0. 94 (12H, m)、1. 6-1. 8 (3H, m)、2. 16 (1H, m)、3. 72 (1H, dd, J=10. 4, 6. 1 Hz)、3. 85 (1H, dd, J=10. 4, 5. 5 Hz)、4. 28 (1H, d, J=6. 1 Hz)、4. 37 (1H, t, J=5. 5 Hz)、4. 51 (1H, dd, J=9. 8, 4. 9 Hz)、7. 31 (2H, d, J=8. 5 Hz)、7. 36 (2H, d, J=8. 5 Hz)。

実施例 6 3

N-(4-エトキシカルボニルフェニル) アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン ((4-EtOCO) Ph-NHCO-SLV) の調製

4-エトキシカルボニルフェニルイソシアネートを用い、実施例 5 4 と同様に反応を行ない、N-(4-エトキシカルボニルフェニル) アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン ((4-EtOCO) Ph-NHCO-

SLV)を得た。

FAB-MS (m/z) : 509 (MH^+)。

1H -NMR (δ , CD_3OD) : 0.94 (12H, m)、1.37 (3H, t, 6.7 Hz)、1.6-1.75 (3H, m)、2.15 (1H, m)、3.75 (1H, dd, $J=10.4, 5.5$ Hz)、3.86 (1H, dd, $J=10.4, 5.5$ Hz)、4.30 (3H, m)、4.39 (1H, m)、4.52 (1H, m)、7.48 (2H, d, $J=8.6$ Hz)、7.90 (2H, d, $J=8.6$ Hz)。

実施例64

N-(3-フルオロフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((3-F)Ph-NHCO-SLV)の調製

3-フルオロフェニルイソシアネートを用い、実施例54と同様に反応を行ない、N-(3-フルオロフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((3-F)Ph-NHCO-SLV)を得た。

FAB-MS (m/z) : 455 (MH^+)。

1H -NMR (δ , CD_3OD) : 0.95 (12H, m)、1.6-1.8 (3H, m)、2.15 (1H, m)、3.72 (1H, dd, $J=11.0, 6.1$ Hz)、3.86 (1H, dd, $J=11.0, 5.5$ Hz)、4.27 (1H, br d, $J=5.5$ Hz)、4.37 (1H, t, $J=5.5$ Hz)、4.51 (1H, dd, $J=9.8, 4.9$ Hz)、6.67 (1H, dd, $J=7.9, 6.7$ Hz)、7.00 (1H, d, $J=7.9$ Hz)、7.21 (1H, dd, $J=11.6, 6.7$ Hz)、7.35 (1H, d, $J=11.6$ Hz)。

実施例65

N-(3-メトキシフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル

-L-バリン ((3-MeO) Ph-NHCO-SLV) の調製

3-メトキシフェニルイソシアネートを用い、実施例54と同様に反応を行ない、N-(3-メトキシフェニル) アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン ((3-MeO) Ph-NHCO-SLV) を得た。

FAB-MS (m/z) : 467 (MH^+)。

1H -NMR (δ , CD_3OD) : 0.95 (12H, m)、1.6-1.8 (3H, m)、2.15 (1H, m)、3.73 (1H, dd, $J=10.4$, 6.1Hz)、3.76 (3H, s)、3.85 (1H, dd, $J=10.4$, 5.5Hz)、4.28 (1H, br)、4.38 (1H, t, $J=5.5$ Hz)、4.52 (1H, dd, $J=9.8$, 5.5Hz)、6.55 (1H, dd, $J=7.9$, 1.8Hz)、6.83 (1H, d, $J=7.9$ Hz)、7.12 (2H, m)。

実施例66N-(3-メチルフェニル) アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン ((3-Me) Ph-NHCO-SLV) の調製

3-メチルフェニルイソシアネートを用い、実施例54と同様に反応を行ない、N-(3-メチルフェニル) アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン ((3-Me) Ph-NHCO-SLV) を得た。

FAB-MS (m/z) : 451 (MH^+)。

1H -NMR (δ , CD_3OD) : 0.95 (12H, m)、1.6-1.8 (3H, m)、2.15 (1H, m)、2.28 (3H, s)、3.70 (1H, dd, $J=10.4$, 6.1Hz)、3.85 (1H, dd, $J=10.4$, 5.5Hz)、4.28 (1H, br)、4.37 (1H, t, $J=5.5$ Hz)、4.52 (1H, dd, $J=9.7$, 5.5Hz)、6.79 (1H, d, $J=7.9$ Hz)、7.12 (2H, m)、7.12 (1H, s)。

実施例 67

N-(4-エチルフェニル) アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン ((4-Et) Ph-NHCO-SLV) の調製

4-エチルフェニルイソシアネートを用い、実施例 54 と同様に反応を行ない、N-(4-エチルフェニル) アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン ((4-Et) Ph-NHCO-SLV) を得た。

FAB-MS (m/z) : 465 (MH^+)。

1H -NMR (δ , CD_3OD) : 0.95 (12H, m)、1.19 (3H, t, $J=7.3$ Hz)、1.6-1.8 (3H, m)、2.15 (1H, m)、3.72 (1H, dd, $J=11.0, 6.1$ Hz)、3.85 (1H, dd, $J=11.0, 4.9$ Hz)、4.27 (1H, br)、4.38 (1H, t, $J=5.5$ Hz)、4.51 (1H, dd, $J=9.8, 5.5$ Hz)、7.08 (2H, d, $J=8.5$ Hz)、7.25 (2H, d, $J=8.5$ Hz)。

実施例 68

N-(2-イソプロピルフェニル) アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン ((2-iPr) Ph-NHCO-SLV) の調製

2-イソプロピルフェニルイソシアネートを用い、実施例 54 と同様に反応を行い、N-(2-イソプロピルフェニル) アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン ((2-iPr) Ph-NHCO-SLV) を得た。

FAB-MS (m/z) : 479 (MH^+)。

1H -NMR (δ , CD_3OD) : 0.95 (12H, m)、1.22 (6H, d, $J=6.7$ Hz)、1.6-1.8 (3H, m)、2.15 (1H, m)、3.18 (1H, m)、3.72 (1H, dd, $J=11.0, 6.1$ Hz)、3.84 (1H, dd, $J=11.0, 5.5$ Hz)、4.29 (1H, m)、

4. 39 (1H, t, $J=5.5$ Hz)、4. 53 (1H, m)、7. 13 (2H, m)、7. 29 (1H, m)、7. 40 (1H, m)。

実施例69

N-(2, 5-ジメトキシフェニル) アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン ((2, 5-(MeO)₂) Ph-NHCO-SLV) の調製

2, 5-ジメトキシフェニルイソシアネートを用い、実施例54と同様に反応を行ない、N-(2, 5-ジメトキシフェニル) アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン ((2, 5-(MeO)₂) Ph-NHCO-SLV) を得た。

FAB-MS (m/z) : 519 ($M+Na^+$)。

¹H-NMR (δ , CD₃ OD) : 0. 93 (12H, m)、1. 6-1. 8 (3H, m)、2. 16 (1H, m)、3. 72 (3H, s)、3. 75 (1H, m)、3. 82 (3H, s)、3. 85 (1H, m)、4. 27 (1H, m)、4. 38 (1H, t, $J=5.5$ Hz)、4. 51 (1H, dd, $J=9.8, 4.9$ Hz)、6. 49 (1H, dd, $J=9.2, 3.1$ Hz)、6. 84 (1H, d, $J=9.2$ Hz)、7. 70 (1H, d, $J=3.1$ Hz)。

実施例70

N-(3-シアノフェニル) アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン ((3-CN) Ph-NHCO-SLV) の調製

3-シアノフェニルイソシアネートを用い、実施例54と同様に反応を行ない、N-(3-シアノフェニル) アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン ((3-CN) Ph-NHCO-SLV) を得た。

FAB-MS (m/z) : 484 ($M+Na^+$)。

¹H-NMR (δ , CD₃ OD) : 0. 95 (12H, m)、1. 6-1. 8

(3H, m)、2.16 (1H, m)、3.75 (1H, dd, $J=11.0$, 6.1 Hz)、3.86 (1H, dd, $J=11.0$, 5.5 Hz)、4.29 (1H, d, $J=6.1$ Hz)、4.38 (1H, t, $J=5.5$ Hz)、4.52 (1H, dd, $J=9.8$, 4.9 Hz)、7.30 (1H, dd, $J=9.2$, 1.2 Hz)、7.41 (1H, t, $J=7.9$ Hz)、7.54 (1H, m)、7.90 (1H, m)。

実施例71

N-(3-メトキシカルボニルアミノフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((3-MeOCONH)Ph-NHCO-SLV)の調製

3-メトキシカルボニルアミノフェニルイソシアネートを用い、実施例54と同様に反応を行ない、N-(3-メトキシカルボニルアミノフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((3-MeOCONH)Ph-NHCO-SLV)を得た。

FAB-MS (m/z) : 532 ($M+Na^+$)。

1H -NMR (δ , CD_3OD) : 0.94 (12H, m)、1.6-1.8 (3H, m)、2.16 (1H, m)、3.72 (3H, s)、3.73 (1H, dd, $J=10.4$, 6.1 Hz)、3.85 (1H, dd, $J=10.4$, 5.5 Hz)、4.27 (1H, br)、4.38 (1H, t, $J=5.5$ Hz)、4.49 (1H, dd, $J=9.8$, 4.9 Hz)、7.08 (2H, m)、7.15 (1H, t, $J=7.9$ Hz)、7.50 (1H, s)。

実施例72

N-(3-トリフルオロメチルフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((3-CF₃)Ph-NHCO-SLV)の調製

3-トリフルオロメチルフェニルイソシアネートを用い、実施例54と同様に

反応を行ない、N-(3-トリフルオロメチルフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((3-CF₃)Ph-NHCO-SLV)を得た。

FAB-MS (m/z) : 527 (M+Na⁺)。

¹H-NMR (δ, CD₃OD) : 0.95 (12H, m)、1.6-1.8 (3H, m)、2.15 (1H, m)、3.75 (1H, dd, J=10.4, 6.1Hz)、3.87 (1H, dd, J=10.4, 5.5Hz)、4.29 (1H, d, J=5.5Hz)、4.39 (1H, t, J=5.5Hz)、4.52 (1H, dd, J=9.8, 4.9Hz)、7.24 (1H, d, J=7.9Hz)、7.41 (1H, t, J=7.9Hz)、7.51 (1H, d, J=7.9Hz)、7.84 (1H, d, J=7.9Hz)。

実施例 73

N-1-ナフチルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (1-Nap-NHCO-SLV) の調製

1-ナフチルイソシアネートを用い、実施例54と同様に反応を行ない、N-1-ナフチルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(1-Nap-NHCO-SLV)を得た。

FAB-MS (m/z) : 509 (M+Na⁺)。

¹H-NMR (δ, CD₃OD) : 0.94 (12H, m)、1.6-1.8 (3H, m)、2.15 (1H, m)、3.78 (1H, dd, J=10.4, 6.1Hz)、3.90 (1H, dd, J=10.4, 5.5Hz)、4.28 (1H, br)、4.45 (1H, t, J=5.5Hz)、4.53 (1H, dd, J=9.8, 5.5Hz)、7.43 (1H, dd, J=8.5, 7.3Hz)、7.50 (2H, m)、7.66 (1H, d, J=8.5Hz)、7.72 (1H, d, J=7.3Hz)、7.86 (1H, d, J=7.3Hz)。

Hz)、8.05 (1H, d, $J=7.7$ Hz)。

実施例 7 4

N-(3,5-ジニトロフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((3,5-(NO₂)₂)Ph-NHCO-SLV)の調製

3,5-ジニトロフェニルイソシアネートを用い、実施例54と同様に反応を行ない、N-(3,5-ジニトロフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((3,5-(NO₂)₂)Ph-NHCO-SLV)を得た。

FAB-MS (m/z) : 549 ($M+Na^+$)。

¹H-NMR (δ , CD₃OD) : 0.95 (12H, m)、1.6-1.8 (3H, m)、2.16 (1H, m)、3.78 (1H, dd, $J=11.0, 6.1$ Hz)、3.89 (1H, dd, $J=11.0, 5.5$ Hz)、4.29 (1H, m)、4.42 (1H, t, $J=5.5$ Hz)、4.54 (1H, m)、8.54 (1H, t, $J=1.8$ Hz)、8.68 (2H, d, $J=1.8$ Hz)。

実施例 7 5

N-(3-アセチルフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(3-Ac)Ph-NHCO-SLV)の調製

3-アセチルフェニルイソシアネートを用い、実施例54と同様に反応を行ない、N-(3-アセチルフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((3-Ac)Ph-NHCO-SLV)を得た。

FAB-MS (m/z) : 501 ($M+Na^+$)。

¹H-NMR (δ , CD₃OD) : 0.95 (12H, m)、1.6-1.8 (3H, m)、2.15 (1H, m)、2.58 (3H, s)、3.75 (1H,

dd, $J=10.4, 6.1\text{ Hz}$)、3.87 (1H, dd, $J=10.4, 5.5\text{ Hz}$)、4.28 (1H, d, $J=6.1\text{ Hz}$)、4.40 (1H, t, $J=5.5\text{ Hz}$)、4.53 (1H, dd, $J=9.8, 4.9\text{ Hz}$)、7.38 (1H, t, $J=7.9\text{ Hz}$)、7.60 (2H, overlapped)、8.03 (1H, s)。

実施例 76

N-(4-イソプロピルフェニル) アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (4-iPr) Ph-NHCO-SLV) の調製

4-イソプロピルフェニルイソシアネートを用い、実施例54と同様に反応を行ない、N-(4-イソプロピルフェニル) アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン ((4-iPr) Ph-NHCO-SLV) を得た

FAB-MS (m/z) : 501 ($M+Na^+$)。

$^1\text{H-NMR}$ (δ , CD_3OD) : 0.95 (12H, m)、1.21 (6H, d, $J=6.7\text{ Hz}$)、1.6-1.8 (3H, m)、2.15 (1H, m)、2.84 (1H, m)、3.73 (1H, dd, $J=10.4, 6.1\text{ Hz}$)、3.85 (1H, dd, $J=10.4, 5.5\text{ Hz}$)、4.27 (1H, d, $J=6.1\text{ Hz}$)、4.38 (1H, t, $J=5.5\text{ Hz}$)、4.52 (1H, dd, $J=9.7, 5.5\text{ Hz}$)、7.11 (2H, d, $J=8.5\text{ Hz}$)、7.26 (2H, d, $J=8.5\text{ Hz}$)。

実施例 77

N-(3-(2-カルボキシベンズアミド) フェニル) アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (3-(Ph t-NH) Ph-NHCO-SLV) の調製

実施例46の中間体として得られるN-(3-アミノフェニル) アミノカルボニル-O-t-ブチル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン-t-ブチルエ

ステルとフタル酸モノ *t*-ブチルエステルとを実施例22と同様の方法により縮合した後、TFAで処理することにより、目的とするN-(3-(2-カルボキシベンズアミド)フェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(3-(Ph *t*-NH)Ph-NHCO-SLV)を得た。

FAB-MS (m/z) : 600 (MH^+)。

1H -NMR (δ , DMSO- d_6) : 0.88 (12H, m)、1.50 (2H, m)、1.64 (1H, m)、2.04 (1H, m)、3.49 (1H, dd, $J=10.4, 6.1$ Hz)、3.66 (1H, dd, $J=10.4, 5.5$ Hz)、4.09 (1H, m)、4.27 (1H, m)、4.40 (1H, m)、6.41 (1H, d, $J=7.3$ Hz)、7.13 (1H, t, $J=7.9$ Hz)、7.22 (1H, t, $J=8.5$ Hz)、7.5-7.7 (3H, m)、7.71 (1H, s)、7.86 (2H, t, $J=7.0$ Hz)、8.09 (1H, d, $J=7.9$ Hz)、8.84 (1H, s)、10.24 (1H, s)。

実施例78

N-(3-フタルイミドフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((3-PhN)-Ph-NHCO-SLV)の調製

実施例77の反応は、N-(3-(2-カルボキシベンズアミド)フェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(3-(Ph *t*-NH)Ph-NHCO-SLV)以外に、N-(3-フタルイミドフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((3-PhN)-Ph-NHCO-SLV)を生成物として与えた。。

FAB-MS (m/z) : 582 (MH^+)。

1H -NMR (δ , CD_3 OD) : 0.94 (12H, m)、1.65-1.75 (3H, m)、2.15 (1H, m)、3.73 (1H, dd, $J=$

10. 4. 5. 5 Hz)、3. 86 (1H, dd, $J=10. 4, 5. 5$ Hz)、4. 27 (1H, d, $J=6. 1$ Hz)、4. 38 (1H, t, $J=5. 5$ Hz)、4. 51 (1H, dd, $J=9. 8, 5. 5$ Hz)、7. 05 (1H, dt, $J=7. 3, 2. 0$ Hz)、7. 40 (2H, m)、7. 54 (1H, t, $J=2. 4$ Hz)、7. 87 (1H, dd, $J=5. 5, 3. 1$ Hz)、7. 95 (1H, dd, $J=5. 5, 3. 1$ Hz)。

実施例 79

N-(3-(3-カルボキシベンズアミド)フェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(3-(Iph t-NH)Ph-NHCO-SLV)の調製

実施例 77 のフタル酸モノ t-ブチルエステルの代わりにイソフタル酸モノメチルエステルを用い、同様に縮合した後、アルカリ加水分解、続いて TFA 処理することによって N-(3-(3-カルボキシベンズアミド)フェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(3-(Iph t-NH)Ph-NHCO-SLV)を得た。

FAB-MS (m/z) : 600 (MH^+)。

1H -NMR (δ , DMSO- d_6) : 0. 86 (12H, m)、1. 52 (2H, m)、1. 63 (1H, m)、2. 03 (1H, m)、3. 50 (1H, dd, $J=10. 4, 6. 1$ Hz)、3. 66 (1H, dd, $J=10. 4, 5. 5$ Hz)、4. 09 (1H, dd, $J=8. 5, 6. 1$ Hz)、4. 28 (1H, m)、4. 40 (1H, m)、6. 43 (1H, d, $J=8$ Hz)、7. 19 (2H, m)、7. 32 (1H, d, $J=7. 9$ Hz)、7. 65 (1H, t, $J=7. 9$ Hz)、7. 84 (2H, overlapped)、8. 11 (2H, overlapped)、8. 17 (1H, d, $J=7. 9$ Hz)、8. 50 (1H, s)、8. 85 (1H, s)、10. 35 (1H, s)。

実施例 80

N-(3-(4-カルボキシベンズアミド)フェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(3-(Tph t-NH)Ph-NHCO-SLV)の調製

テレフタル酸モノメチルエステルを用い、実施例79と同様に反応を行いN-(3-(4-カルボキシベンズアミド)フェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(3-(Tph t-NH)Ph-NHCO-SLV)を得た。

FAB-MS (m/z) : 600 (MH⁺)。

¹H-NMR (δ, CD₃OD) : 0.94 (12H, m)、1.55-1.70 (3H, m)、2.15 (1H, m)、3.74 (1H, dd, J=11.0, 6.1Hz)、3.86 (1H, dd, J=11.0, 5.5Hz)、4.29 (1H, m)、4.40 (1H, t, J=5.5Hz)、4.53 (1H, m)、7.24 (2H, m)、7.33 (1H, m)、7.79 (1H, s)、7.99 (2H, d, J=7.9Hz)、8.14 (2H, d, J=7.9Hz)。

実施例 81

N-(3-(4-カルボキシブタナミド)フェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(3-(HOCO(CH₂)₃-CONH)Ph-NHCO-SLV)の調製

グルタル酸モノエチルエステルを用い、実施例79と同様に反応を行いN-(3-(4-カルボキシブタナミド)フェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(3-(HOCO(CH₂)₃-CONH)Ph-NHCO-SLV)を得た。

FAB-MS (m/z) : 566 (MH⁺)。

$^1\text{H-NMR}$ (δ , CD_3OD) : 0.94 (12H, m)、1.60–1.75 (3H, m)、1.96 (2H, m)、2.15 (1H, m)、2.40 (4H, m)、3.72 (1H, dd, $J=10.4, 6.1\text{Hz}$)、3.85 (1H, dd, $J=10.4, 5.5\text{Hz}$)、4.28 (1H, m)、4.38 (1H, t, $J=5.5\text{Hz}$)、4.50 (1H, dd, $J=9.7, 4.9\text{Hz}$)、7.17 (3H, m)、7.61 (1H, s)。

実施例82

N-(3-テトラデカナミドフェニル) アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (3- CH_3 (CH_2) $_{12}$ -CONH) Ph-NHCO-SLV) の調製

実施例77のフタル酸モノ t-ブチルエステルの代わりに、ミリスチン酸を用いて同様の反応を行い N-(3-テトラデカナミドフェニル) アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (3-(CH_3 (CH_2) $_{12}$ -CONH) Ph-NHCO-SLV)

FAB-MS (m/z) : 662 (MH^+)。

$^1\text{H-NMR}$ (δ , CD_3OD) : 0.89 (3H, t, $J=7.3\text{Hz}$)、0.95 (12H, m)、1.25–1.40 (20H, m)、1.60–1.75 (5H, m)、2.15 (1H, m)、2.34 (2H, t, $J=7.3\text{Hz}$)、3.72 (1H, dd, $J=10.4, 6.1\text{Hz}$)、3.85 (1H, dd, $J=10.4, 5.5\text{Hz}$)、4.28 (1H, d, $J=5.5\text{Hz}$)、4.39 (1H, t, $J=5.5\text{Hz}$)、4.51 (1H, dd, $J=9.8, 4.9\text{Hz}$)、7.16 (3H, m)、7.62 (1H, s)。

実施例83

インビトロでのFas と PTP-BASの結合阻害

実施例32の方法に従い、SLVのN末端修飾体 ($10\mu\text{M}$) のインビトロ

F a s / P T P - B A S の結合阻害活性を測定した。第6表にN末端修飾体によるインビトロ結合阻害活性を示す。

第6表 インビトロでのFas と PTP-BASの結合阻害

被検物質	阻害率 (%)
実施例 4 5	4 8. 7
実施例 4 6	6 1. 1
実施例 4 7	5 5. 9
実施例 4 8	4 7. 8
実施例 4 9	7 6. 8
実施例 5 0	6 6. 6
実施例 5 1	5 5. 9
実施例 5 2	7 5. 6
実施例 5 3	6 0. 8
実施例 5 4	4 6. 8
実施例 5 5	3 0. 5
実施例 5 6	4 1. 1
実施例 5 7	3 9. 9
実施例 5 8	4 3. 4
実施例 5 9	2 5. 8
実施例 6 0	2 6. 9
実施例 6 1	4 9. 1
実施例 6 2	1 8. 6
実施例 6 3	3 0. 6
実施例 6 4	3 7. 6

実施例 6 5	3 2. 9
実施例 6 6	3 9. 3
実施例 6 7	4 8. 8
実施例 6 8	2 1. 7
実施例 6 9	2 3. 0
実施例 7 0	2 1. 9
実施例 7 1	4 9. 4
実施例 7 2	2 8. 7
実施例 7 3	2 8. 4
実施例 7 4	1 8. 3
実施例 7 5	3 0. 4
実施例 7 6	2 8. 1
実施例 7 7	6 3. 2
実施例 7 8	7 4. 7
実施例 7 9	6 8. 3
実施例 8 0	6 7. 2
実施例 8 1	6 7. 5
実施例 8 2	3 6. 0
Ph-NHCO-SLV	4 5. 9

実施例 8 4

Ac-SLVのマイクロインジェクションによる大腸癌株への細胞死の誘導

(その2)

直径35mmのプラスチックシャーレ中にマイクログリッドカバースリップ
(セロケイト、エッペンドルフ社)を固定し、このシャーレ中で2mlの培養液
(10%FCSを含むRPMI 1640メディウム、日水製薬社)を用いて1x

THIS PAGE BLANK (USPTO)

10^5 個のヒト大腸癌細胞DLD-1を24時間、37℃、5%炭酸ガスの条件下で培養した。マイクログリッドカバースリップに接着した細胞に、マイクロニューピュレータ（エッペンドルフ社）、マイクロインジェクター（エッペンドルフ社）、およびガラス針（フェムトチップ、エッペンドルフ社）を用い、注入圧力50hPa、注入時間0.4秒の条件で0.1%FITC-デキストランを含むK-PBS中で100mMに調製したAc-SLV、Ac-SLYもしくはコントロールとしてK-PBSのみをそれぞれ50から100個の細胞に注入した。なお、抗Fas抗体（CH-11）処理細胞では、マイクロインジェクション直前に500ng/mlのCH-11をシャーレに添加した。マイクロインジェクションの16から20時間後に1%Hoechst 33342を含むPBSで核を染色し、写真撮影した。FITCで染色された細胞の内、位相差顕微鏡像およびHoechst 33342染色による核の形態変化によりアポトーシスを起こしている細胞を判定し、細胞数を数えた。

第7表に示すとおり、癌細胞内に注入されたAc-SLVが抗Fas抗体に対する癌細胞の感受性を高め、癌細胞に細胞死を誘導することが示された。

第7表

抗Fas抗体(CH-11)	アポトーシスを起こした細胞 (%)		
	Ac-SLV	Ac-SLY	K-PBSのみ
0 ng/ml	21.7	21.3	23.0
500 ng/ml	49.8	24.8	23.4

実施例85

IL-8で誘導される好中球遊走の抑制

IL-8によるヒト好中球の遊走に対する本発明化合物（Ph-NHCO-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TTL-OEt)の影響を、ケモタキシスチャンバーを用いて、下室へ移動してきた好中球をカウントすることで評価した。ケモタキシスチャンバーのフィルターはNeuro probe社製(ポアサイズ $3\mu\text{m}$)を用いた。好中球、IL-8、サンプルの希釈等には0.1%BSAを含むRPMI培地を用いた。下室に 10^{-8}M のIL-8を $162\mu\text{l}$ 加え、上室に好中球浮遊液 $100\mu\text{l}$ (10^6 個)を入れた。37℃で30分インキュベートし下室に移動した好中球をコールターカウンターにてカウントした。サンプル無添加を100%としたときの遊走率(%)を求めた。得られた結果を次表に示す。

第8表

化合物濃度* (M)	遊走 (%)	阻害率 (%)
0	100	—
10^{-7}	113.7	0
10^{-6}	75.9	24.1
10^{-5}	26.1	73.9
10^{-4}	19.4	80.6

*化合物はPh-NHCO-TTL-OEtを使用

産業上の利用可能性

本発明の化合物は、細胞膜レセプターの機能を調節する活性を有することから、細胞膜レセプターのシグナル伝達にかかわる疾病の治療剤に利用しうる。

また、本発明の化合物は、細胞膜レセプターのC末端の機能を解析する方法および細胞膜レセプターのシグナル伝達を調節する方法においても利用しうる。

請 求 の 範 囲

1. 細胞内カルボキシ末端のアミノ酸配列が $-A_1-A_2-A_3$ である細胞膜レセプターの機能を調節する活性を有する、少なくとも3個のアミノ酸配列を長さ方向に有し、 $-X-Y-Z$ （式中、 $X=A_1$ もしくは A_1 と同一分類に属するアミノ酸； $Y=L$ -アミノ酸あるいはグリシン； $Z=A_3$ もしくは A_3 と同一分類に属するアミノ酸）のカルボキシ末端配列を有するペプチド、その生物学的安定性、細胞膜透過性、あるいは上記調節活性が向上された該ペプチドの誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。

2. $-X-Y-Z$ の式中、 A_1 が L -セリンあるいは L -スレオニンのとき、 $X=\beta$ 位に水酸基あるいはチオール基を有するアミノ酸、 A_1 が L -セリンあるいは L -スレオニン以外のアミノ酸のとき、 $X=A_1$ ； $Y=L$ -アミノ酸あるいはグリシン； $Z=A_3$ もしくは A_3 と同一分類に属するアミノ酸のカルボキシ末端配列を有する、請求項1のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。

3. $-X-Y-Z$ の式中、 A_1 が L -セリンあるいは L -スレオニンであるとき、 $X=\beta$ 位に水酸基あるいはチオール基を有するアミノ酸； $Y=L$ -アミノ酸あるいはグリシン； $Z=A_3$ もしくは A_3 と同一分類に属するアミノ酸のカルボキシ末端配列を有する、請求項1のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。

4. $-X-Y-Z$ の式中、 $X=A_1$ もしくは A_1 と同一分類に属するアミノ酸； $Y=L$ -アミノ酸あるいはグリシン； $Z=A_3$ のカルボキシ末端配列を有する、請求項1のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。

5. $-X-Y-Z$ の式中、 A_1 が L -セリンあるいは L -スレオニンのとき、 $X=\beta$ 位に水酸基あるいはチオール基を有するアミノ酸、 A_1 が L -セリンある

いはL-スレオニン以外のアミノ酸のとき、 $X = A_1$ ； $Y = L$ -アミノ酸あるいはグリシン； $Z = A_3$ のカルボキシ末端配列を有する、請求項1のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。

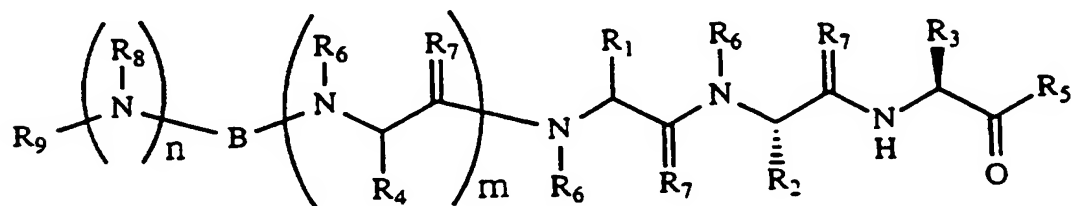
6. $-X-Y-Z$ の式中、 A_1 がL-セリンあるいはL-スレオニンであるとき、 $X = \beta$ 位に水酸基あるいはチオール基を有するアミノ酸； $Y = L$ -アミノ酸あるいはグリシン； $Z = A_3$ のカルボキシ末端配列を有する、請求項1のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。

7. $-X-Y-Z$ の式中、 $X = A_1$ ； $Y = L$ -アミノ酸あるいはグリシン； $Z = A_3$ のカルボキシ末端配列を有する、請求項1のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。

8. $-X-Y-Z$ の式中、 $X = A_1$ ； $Y = A_2$ ； $Z = A_3$ のカルボキシ末端配列を有する、請求項1のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。

9. 細胞内カルボキシ末端のアミノ酸配列が $-A_1-A_2-A_3$ である細胞膜レセプターの機能を調節する活性を有する、

式1：



〔式中、 $R_1 = A_1$ もしくは A_1 と同一分類に属するアミノ酸の側鎖構造； $R_2 = L$ -アミノ酸の側鎖構造あるいは水素； $R_3 = A_3$ もしくは A_3 と同一分類に属するアミノ酸の側鎖構造を意味し、 R_4 は任意のアミノ酸の側鎖構造であり、

R_5 は置換あるいは非置換である C_1 乃至 C_6 の直鎖、分鎖、または環状のアルコキシ基であるか、または水酸基であり、各 R_6 は個々に水素あるいはメチル基であり、各 R_7 は個々に水素あるいは酸素であり、 B はカルボニル基あるいは直接結合であり、 R_8 および R_9 はそれぞれ水素、あるいは置換もしくは非置換アルキル基、または置換もしくは非置換芳香族基であり、この場合アルキル基は直鎖、分鎖、または環状であり、 m は 0 乃至 12 であり、 n は 0 あるいは 1 であり、さらに n が 1 の場合は R_8 と R_9 は一緒になって環を形成してもよい；ただし、 R_6 および R_9 は同時に水素ではない] で表される、請求項 1 のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。

10. A_1 が L-セリンあるいは L-スレオニンのとき、 $R_1 = \beta$ 位に水酸基あるいはチオール基を有するアミノ酸の側鎖構造、 A_1 が L-セリンあるいは L-スレオニン以外のアミノ酸のとき、 $R_1 = A_1$ の側鎖構造； $R_2 = L$ -アミノ酸の側鎖構造あるいは水素； $R_3 = A_3$ もしくは A_3 と同一分類に属するアミノ酸の側鎖構造である、請求項 9 のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。

11. A_1 が L-セリンあるいは L-スレオニンのとき、 $R_1 = \beta$ 位に水酸基あるいはチオール基を有するアミノ酸の側鎖構造； $R_2 = L$ -アミノ酸の側鎖構造あるいは水素； $R_3 = A_3$ もしくは A_3 と同一分類に属するアミノ酸の側鎖構造である、請求項 9 のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。

12. $R_1 = A_1$ もしくは A_1 と同一分類に属するアミノ酸の側鎖構造； $R_2 = L$ -アミノ酸の側鎖構造あるいは水素； $R_3 = A_3$ の側鎖構造である、請求項 9 のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。

13. A_1 が L-セリンあるいは L-スレオニンのとき、 $R_1 = \beta$ 位に水酸基あるいはチオール基を有するアミノ酸の側鎖構造、 A_1 が L-セリンあるいは

L-スレオニン以外のアミノ酸のとき、 $R_1 = A_1$ の側鎖構造； $R_2 = L$ -アミノ酸の側鎖構造あるいは水素； $R_3 = A_3$ の側鎖構造である、請求項9のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。

14. A_1 がL-セリンあるいはL-スレオニンのとき、 $R_1 = \beta$ 位に水酸基あるいはチオール基を有するアミノ酸の側鎖構造； $R_2 = L$ -アミノ酸の側鎖構造あるいは水素； $R_3 = A_3$ の側鎖構造である、請求項9のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。

15. $R_1 = A_1$ の側鎖構造； $R_2 = L$ -アミノ酸の側鎖構造あるいは水素； $R_3 = A_3$ の側鎖構造である、請求項9のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。

16. $R_1 = A_1$ の側鎖構造； $R_2 = A_2$ の側鎖構造； $R_3 = A_3$ の側鎖構造である、請求項9のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。

17. $m = 0$ 乃至5である、請求項9乃至16のいずれか一項に記載のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。

18. $m = 0$ 乃至3である、請求項9乃至16のいずれか一項に記載のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。

19. $m = 0$ である、請求項9乃至16のいずれか一項に記載のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。

20. n が0でありBがカルボニル基であり、かつ R_9 がメチル基であるか；あるいは R_5 が置換または非置換である C_1 乃至 C_6 の直鎖、分鎖、または環状のアルコキシ基であるか；あるいは、 n が0でありBがカルボニル基であり、かつ R_9 がメチル基であり、かつ R_5 が置換あるいは非置換である C_1 乃至 C_6 の直鎖、分鎖、または環状のアルコキシ基である、請求項9乃至19のいずれか一項に記載のペプチド誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。

21. Bがカルボニル基であり、 R_9 が置換もしくは非置換アルキル基、または置換もしくは非置換芳香族基である、請求項9乃至19のいずれか一項に記載のペプチド誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。

22. R_5 が置換または非置換である C_1 乃至 C_6 の直鎖、分鎖、または環状のアルコキシ基である、請求項21のペプチド誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。

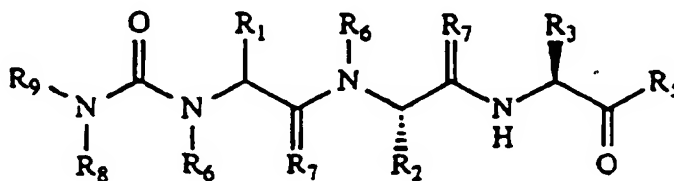
23. R_7 の少なくとも一つが水素である、請求項9乃至22のいずれか一項に記載のペプチド誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。

24. R_1 あるいは R_4 を側鎖に有する炭素の立体配置の少なくとも一つが、S配置あるいはR配置である、請求項9乃至22のいずれか一項に記載のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。

25. R_6 の少なくとも一つがメチル基である、請求項9乃至22のいずれか一項に記載のペプチド誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。

26.

式2:

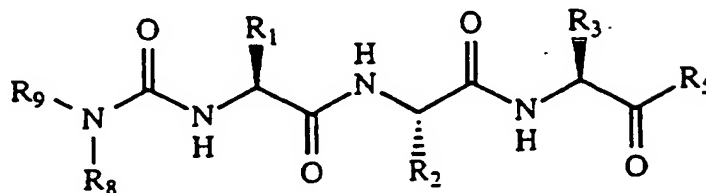


[式中、 R_1 = L-セリンもしくはL-スレオニンの側鎖構造； R_2 = L-アミノ酸の側鎖構造あるいは水素； R_3 = L-アミノ酸の側鎖構造あるいは水素を意味し、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 および R_9 は前述と同義である；ただし、 R_1 がセリンの側鎖であり、かつ R_2 がメチオニンの側鎖であり、かつ R_3 がグルタミンの側鎖である場合を除く] で表される、請求項9のペプチド、その誘導体、お

よびそれらの薬学的に容認される塩。

27.

式3:



[式中、 R_1 = L-セリンもしくはL-スレオニンの側鎖構造； R_2 = L-アミノ酸の側鎖構造あるいは水素； R_3 = L-バリン、L-イソロイシンあるいはL-ロイシンの側鎖構造を意味し、 R_5 、 R_8 および R_9 は前述と同義である] で表される、請求項9のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。

28. 細胞膜レセプターの細胞内カルボキシ末端が tSXXモチーフである、請求項1乃至27のいずれか一項に記載のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。

29. 細胞膜レセプターの細胞内カルボキシ末端が tSXVモチーフである、請求項1乃至27のいずれか一項に記載のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。

30. 細胞膜レセプターの細胞内カルボキシ末端が tSXLモチーフである、請求項1乃至27のいずれか一項に記載のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。

31. 細胞膜レセプターが Fas である、請求項1乃至27のいずれか一項に記載のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。

32. Fas のカルボキシ末端と PTP-BAS との結合を阻害する活性を

有する、請求項1乃至27のいずれか一項に記載のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。

33. 細胞膜レセプターがVIPレセプターである、請求項1乃至27のいずれか一項に記載のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。

34. 細胞膜レセプターが β_2 -アドレナジックレセプターである、請求項1乃至27のいずれか一項に記載のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。

35. 細胞膜レセプターがIL-8レセプターである、請求項1乃至27のいずれか一項に記載のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。

36. 薬学上容認される担体、及び、請求項1乃至35のいずれか一項に記載の化合物の治療有効量を含む医薬組成物。

37. 細胞膜レセプターがFasあるいはVIPレセプターであり、抗腫瘍剤である、請求項36の医薬組成物。

38. 細胞膜レセプターがIL-8レセプターであり、炎症性疾患の治療剤である、請求項36の医薬組成物。

39. 細胞膜レセプターが β_2 -アドレナジックレセプターであり、循環器系疾患の治療剤である、請求項36の医薬組成物。

40. 請求項1乃至27のいずれか一項に記載の化合物を用いて細胞膜レセプターのカルボキシ末端の機能を解析する方法。

41. 細胞膜レセプターが発現している細胞あるいは組織に該レセプターのリガンドもしくはそのアゴニストを併用する、請求項40の方法。

42. 細胞膜レセプターのシグナル伝達にかかわる疾病の哺乳動物に治療有効量の、請求項1乃至35のいずれか一項に記載の化合物を投与することからな

る、細胞膜レセプターのシグナル伝達にかかわる疾病の治療方法。

43. 細胞膜レセプターのシグナル伝達にかかわる疾病が、腫瘍、炎症性疾患または循環器系疾患である、請求項42の治療方法。

1 / 15

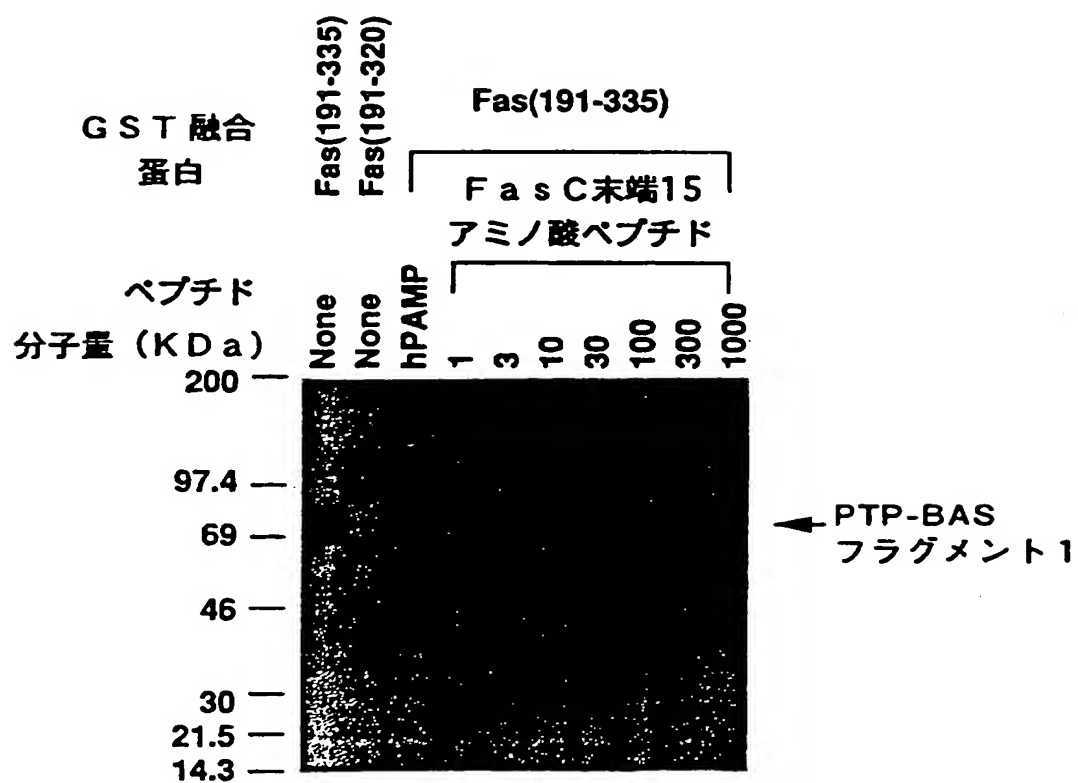


FIG. 1

2/15

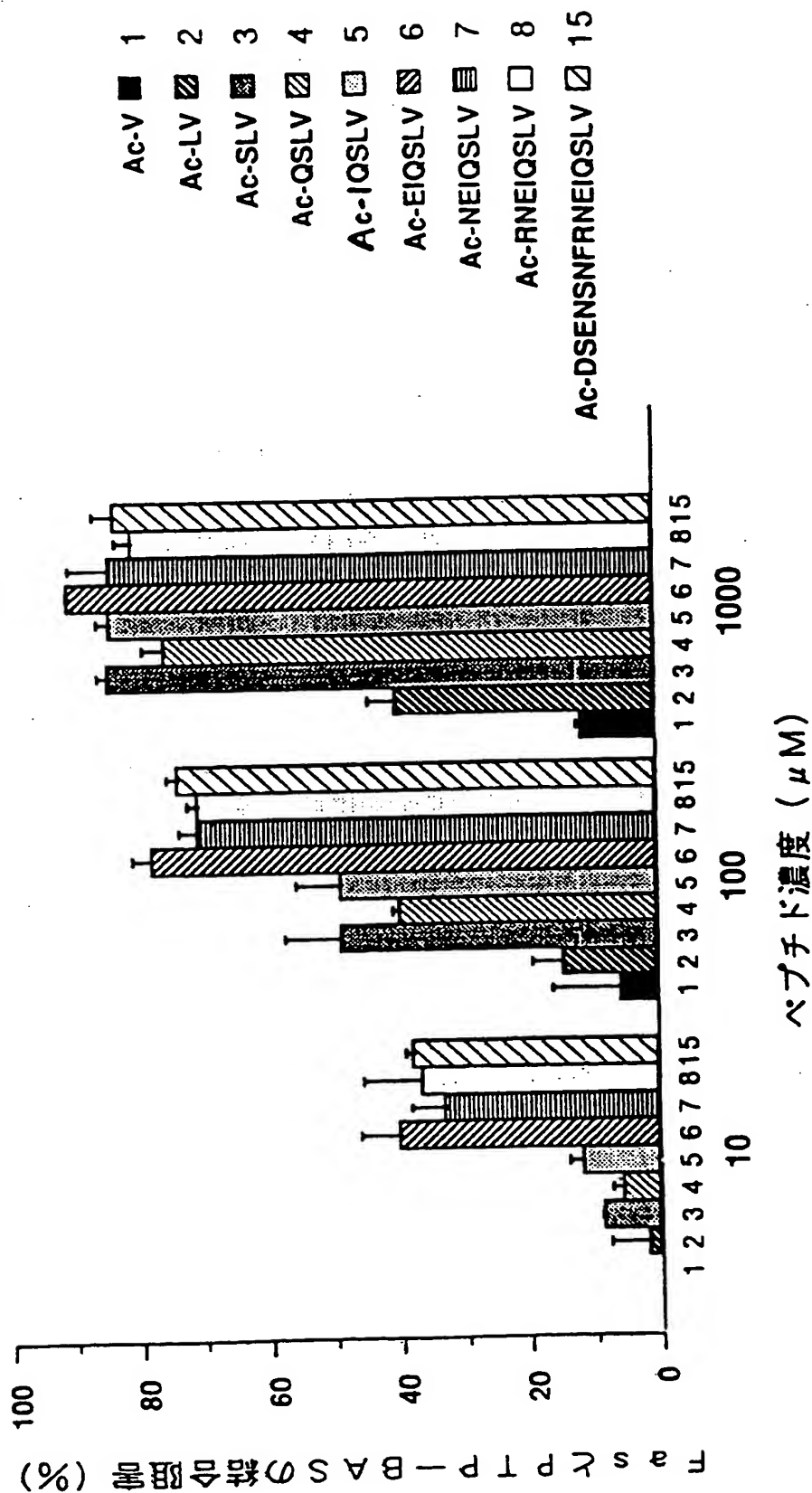


FIG. 2

3/15

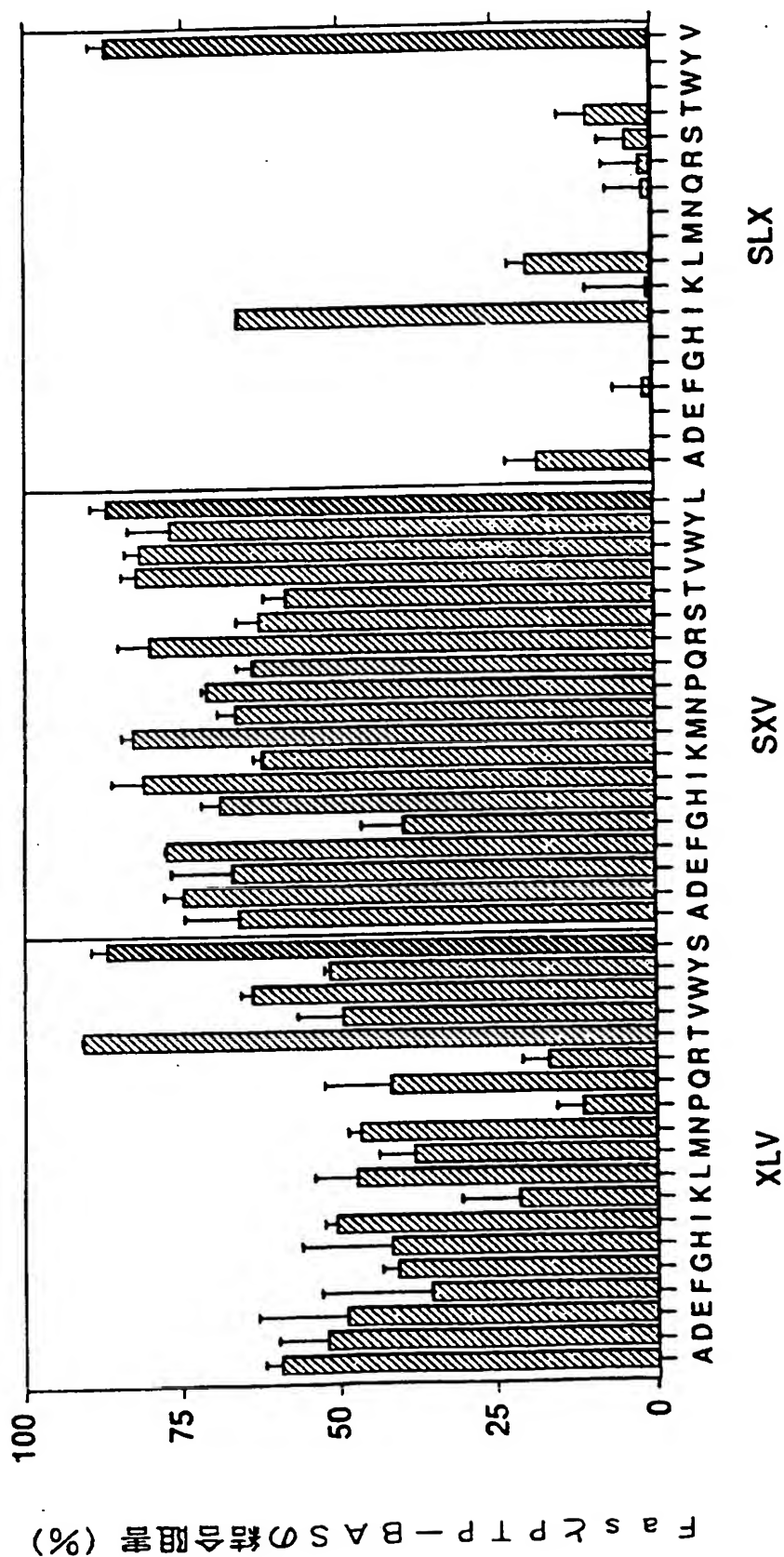


FIG. 3

4/15

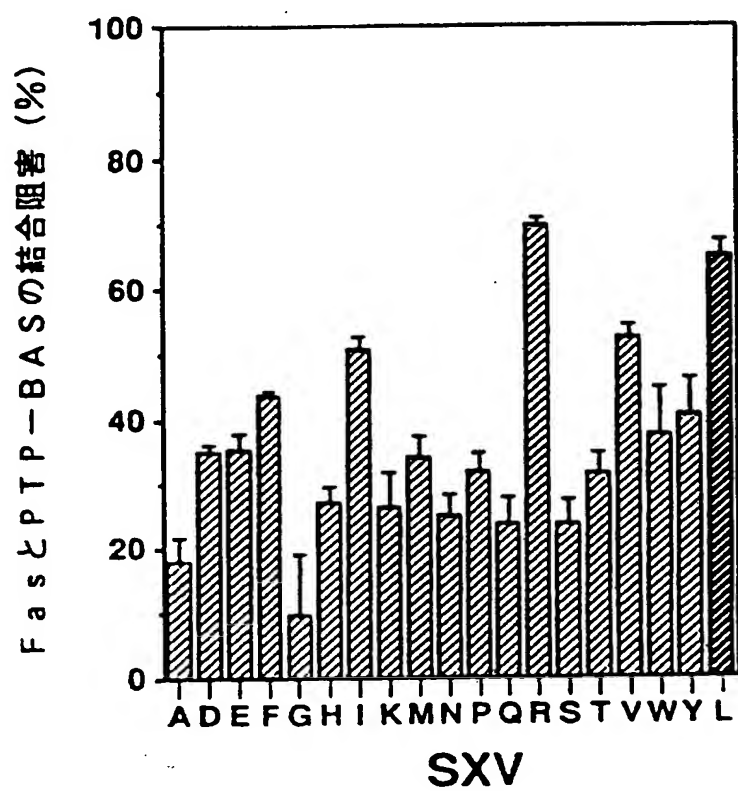


FIG. 4

5/15

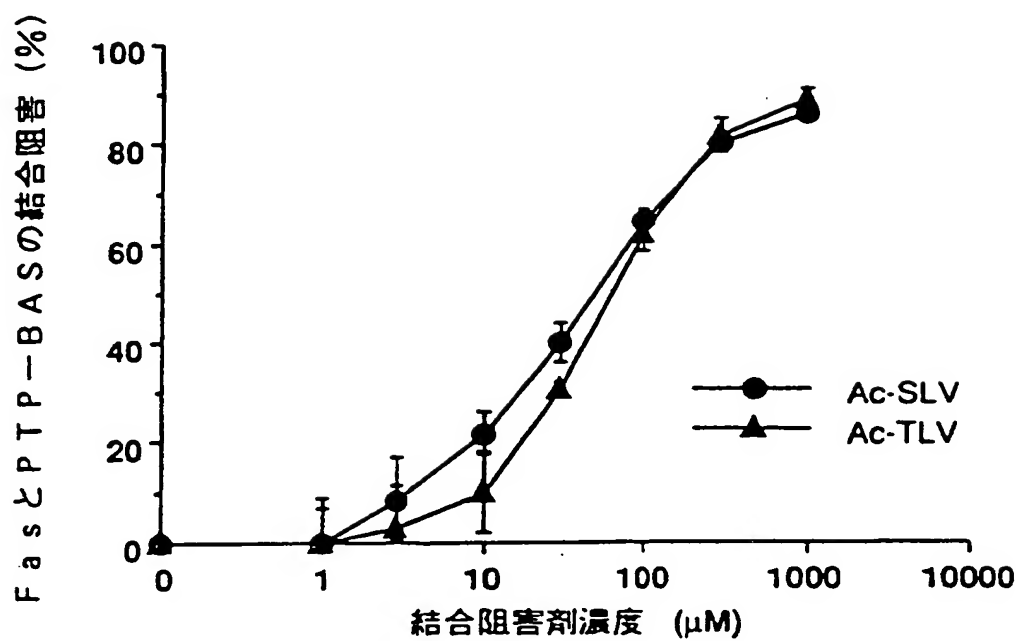


FIG. 5

6/15

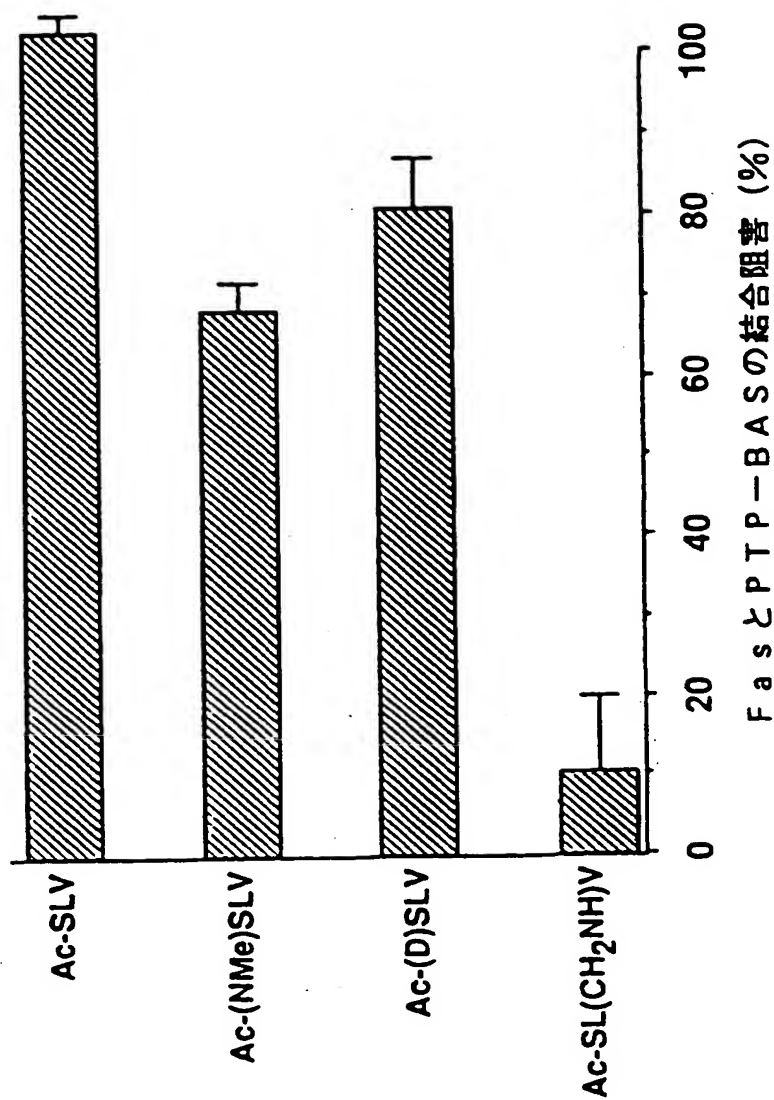


FIG. 6

7/15

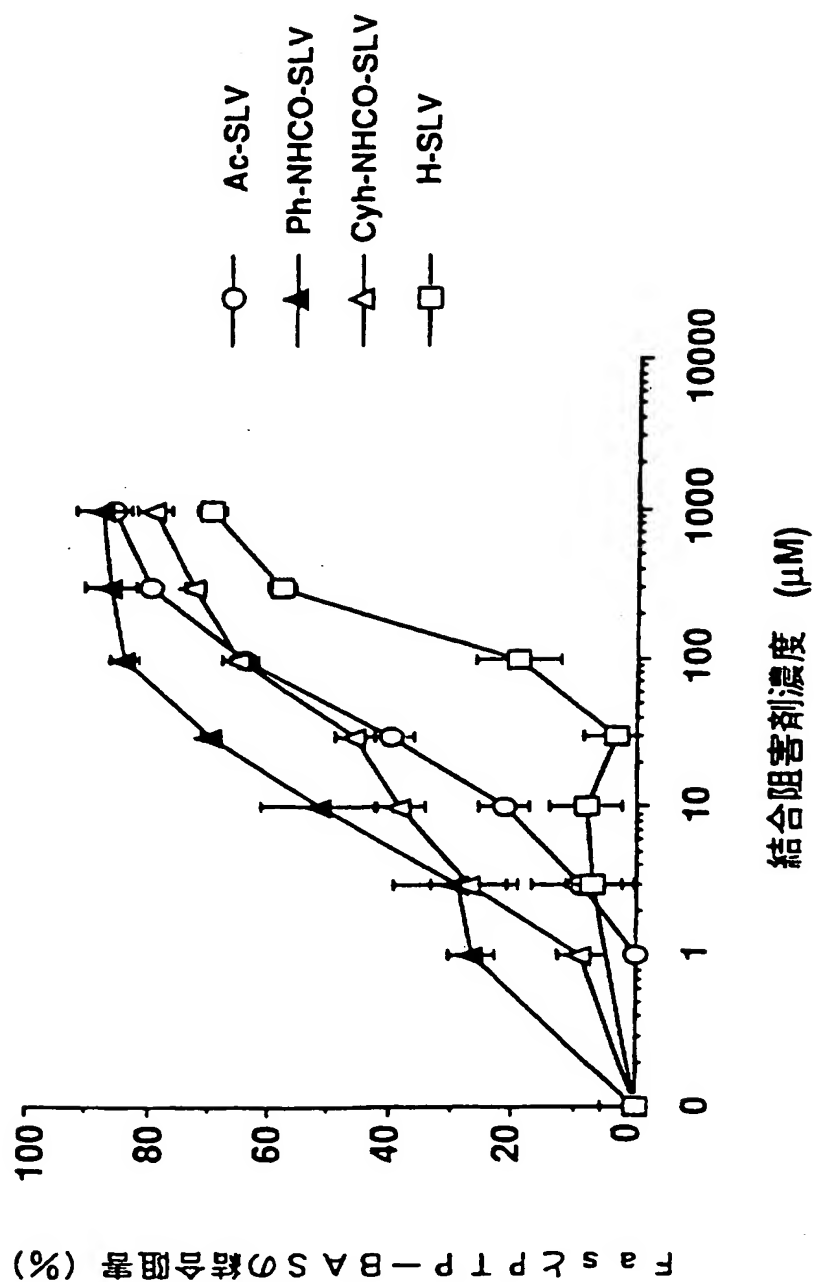


FIG. 7

8/15

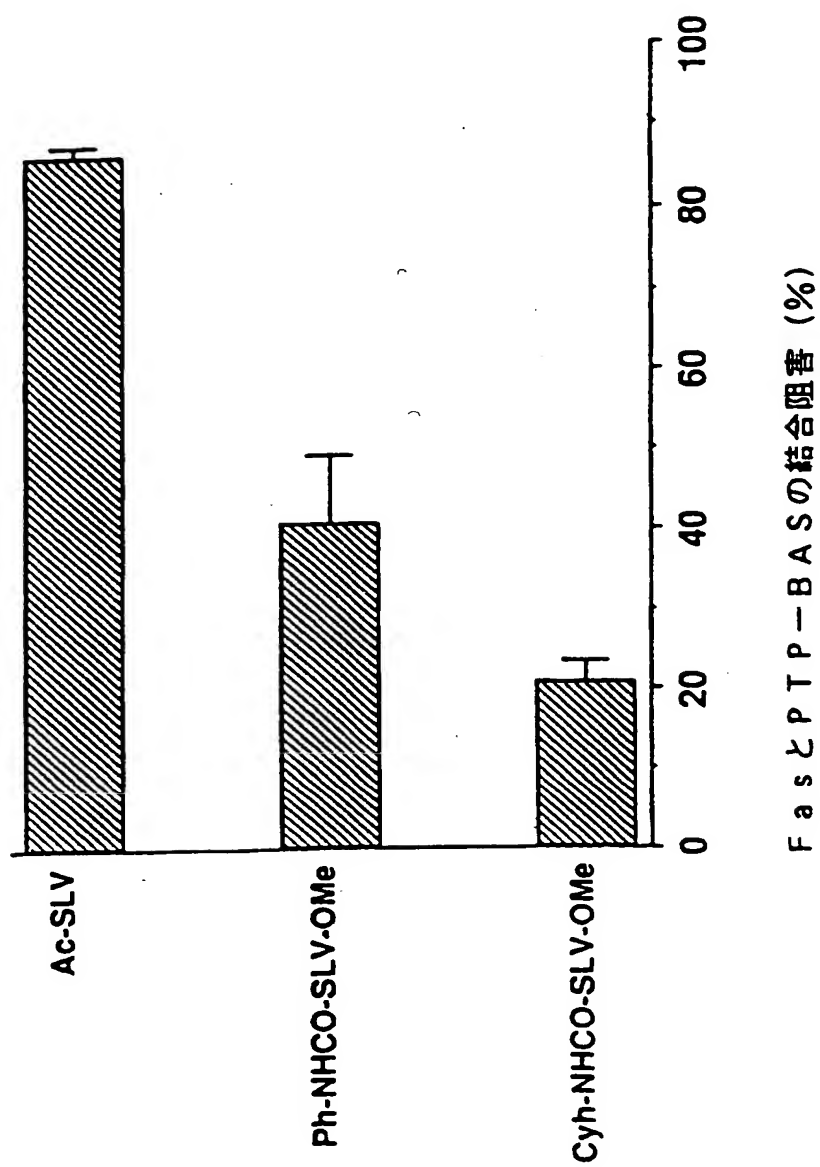


FIG. 8

9/15

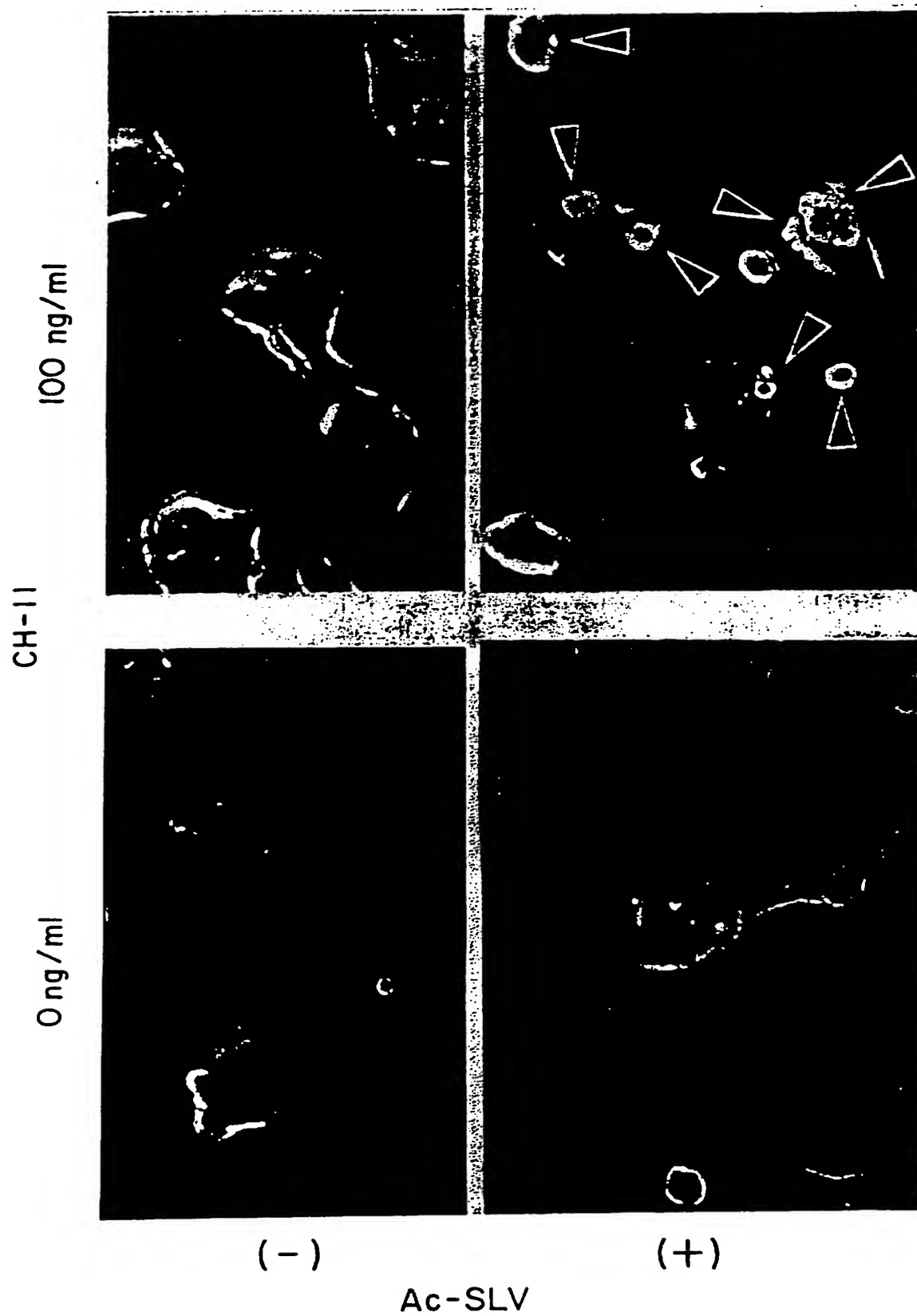


FIG. 9

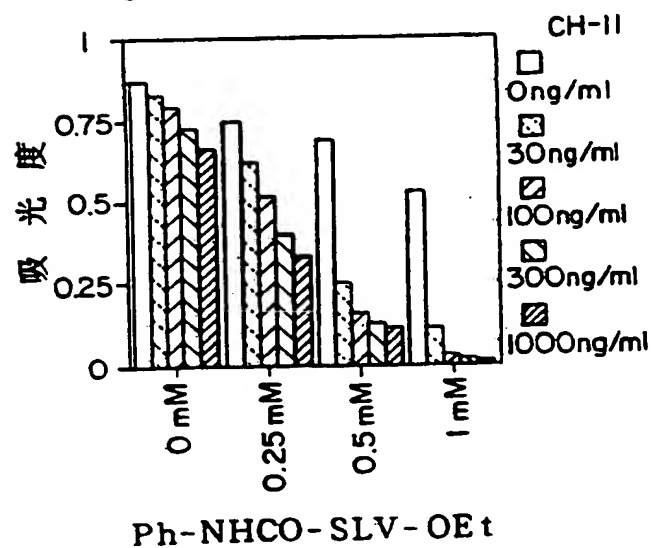
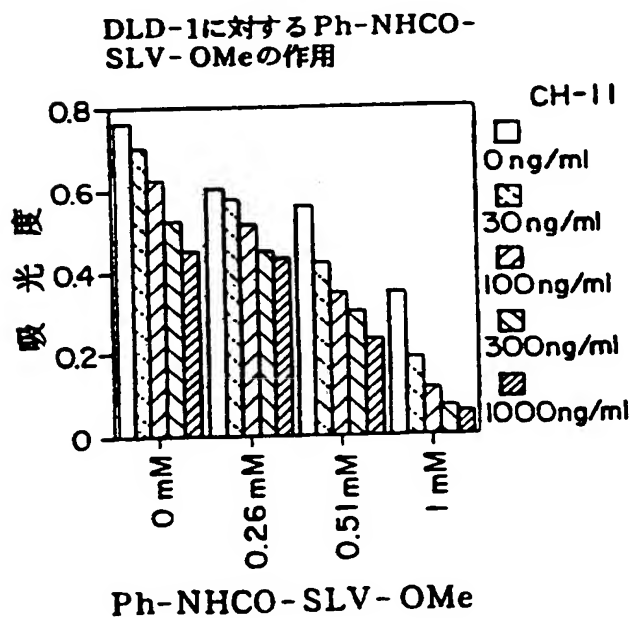
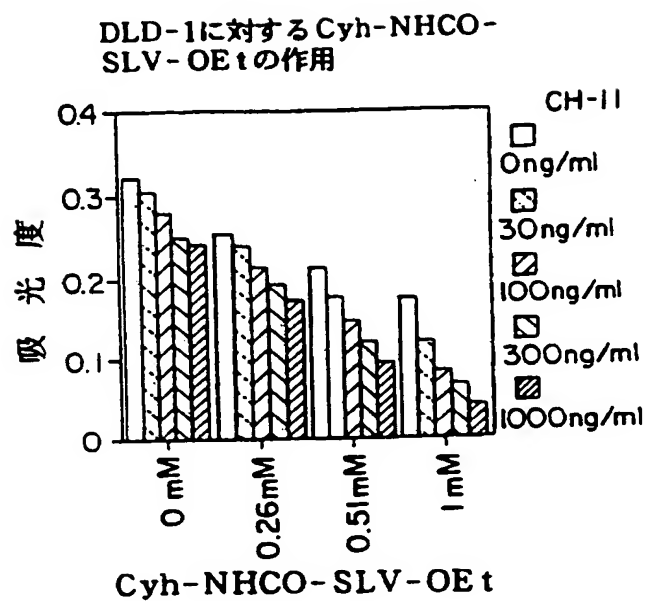
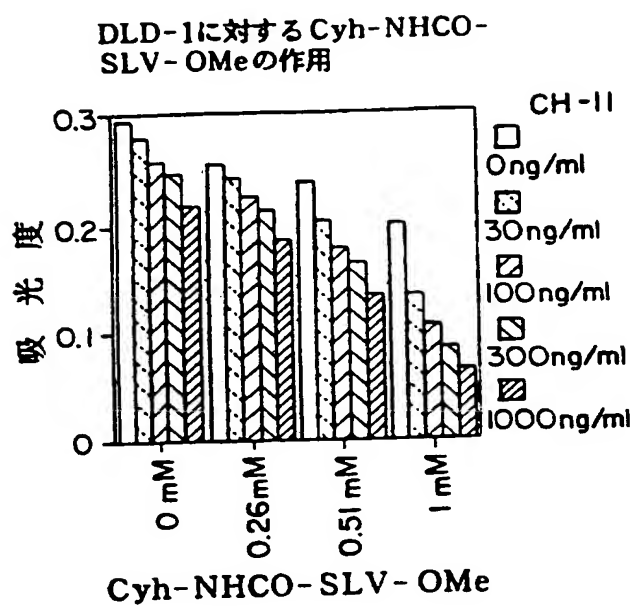


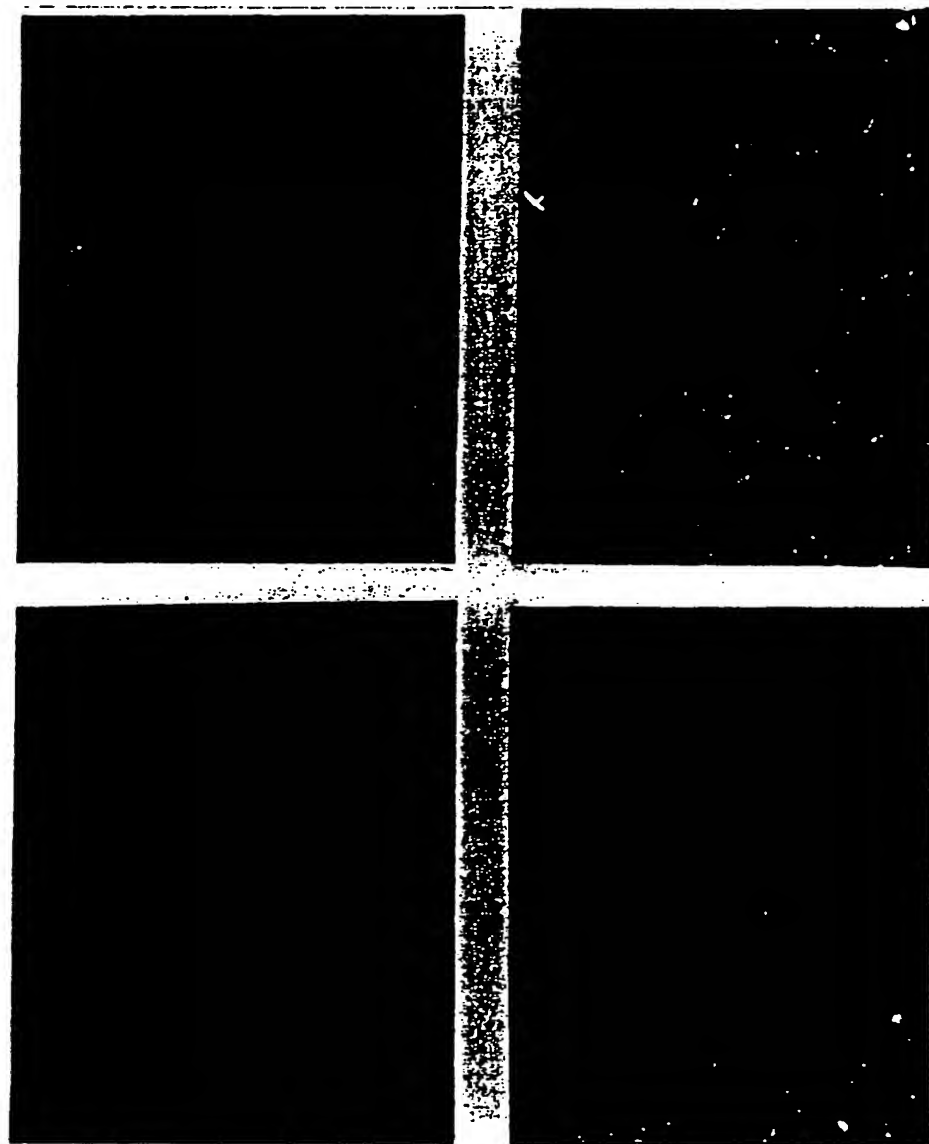
FIG. 10

11/15

Ph-NHCO-SLV-OEt

0 mM

0.25 mM



0 ng/ml

30 ng/ml

CH-11

FIG. 11

12/15

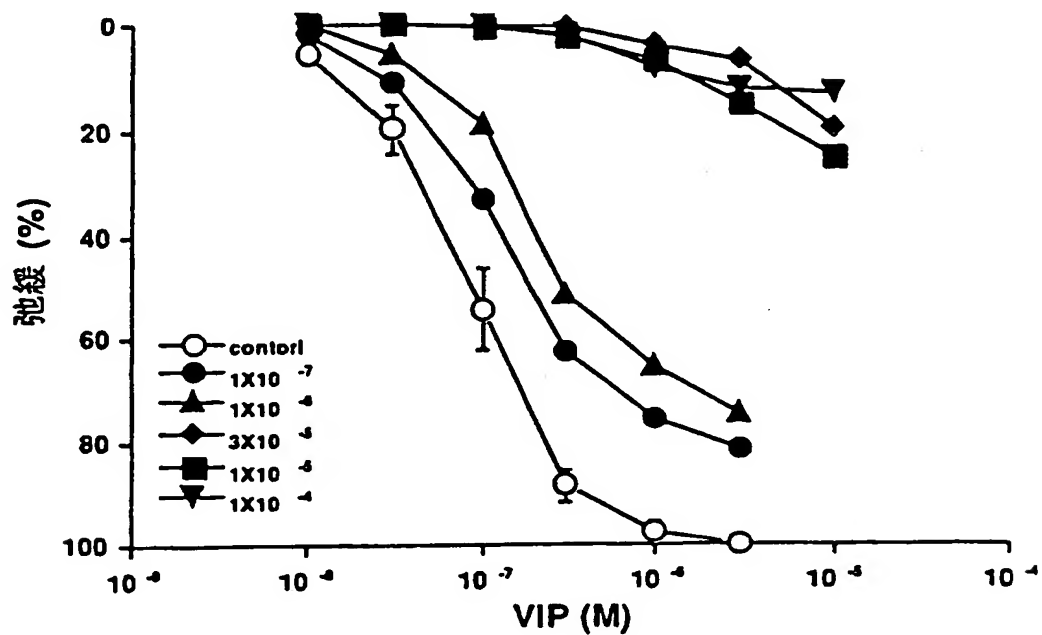


FIG. 12

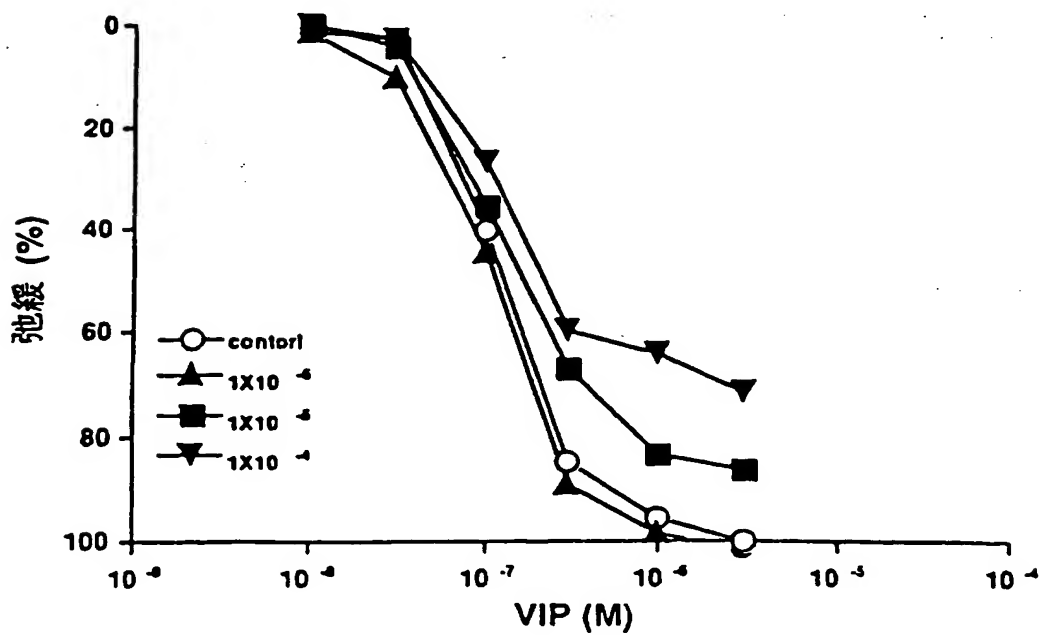


FIG. 13

13/15

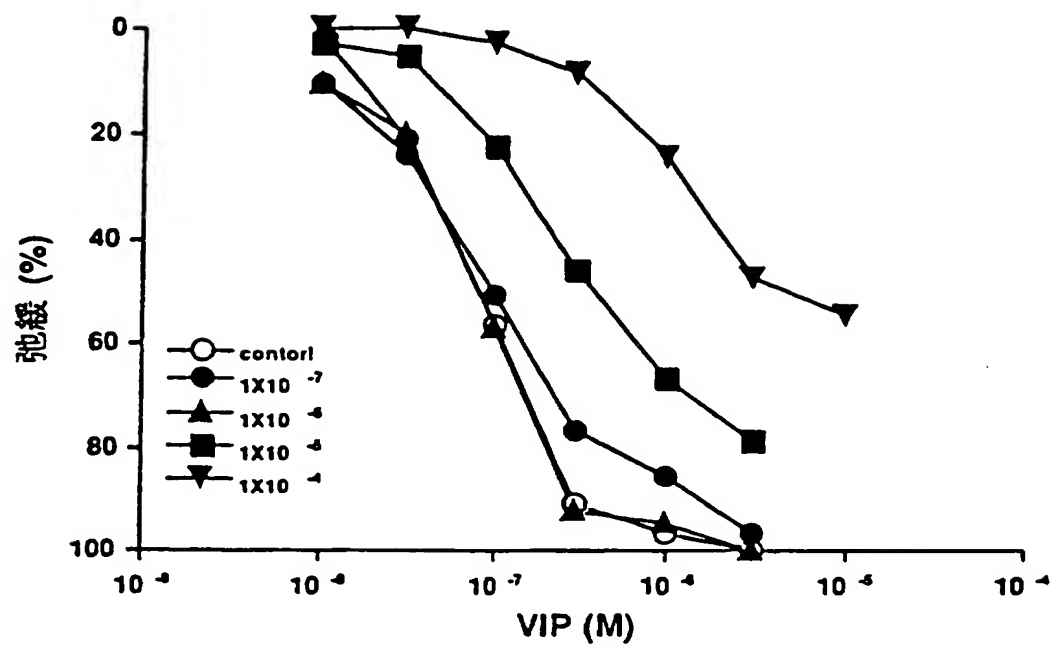


FIG. 14

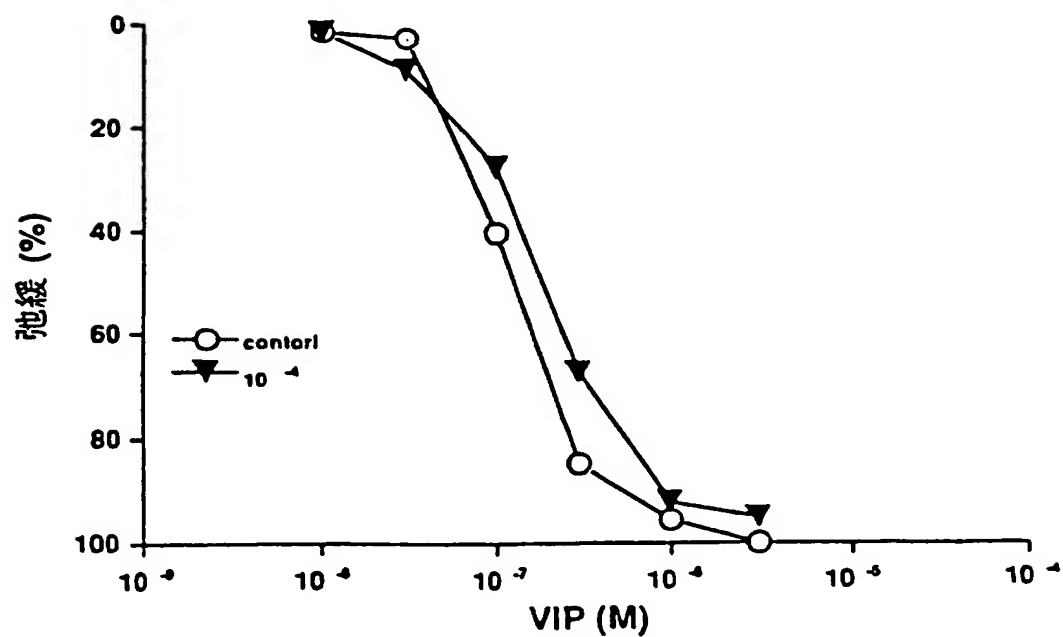


FIG. 15

14/15

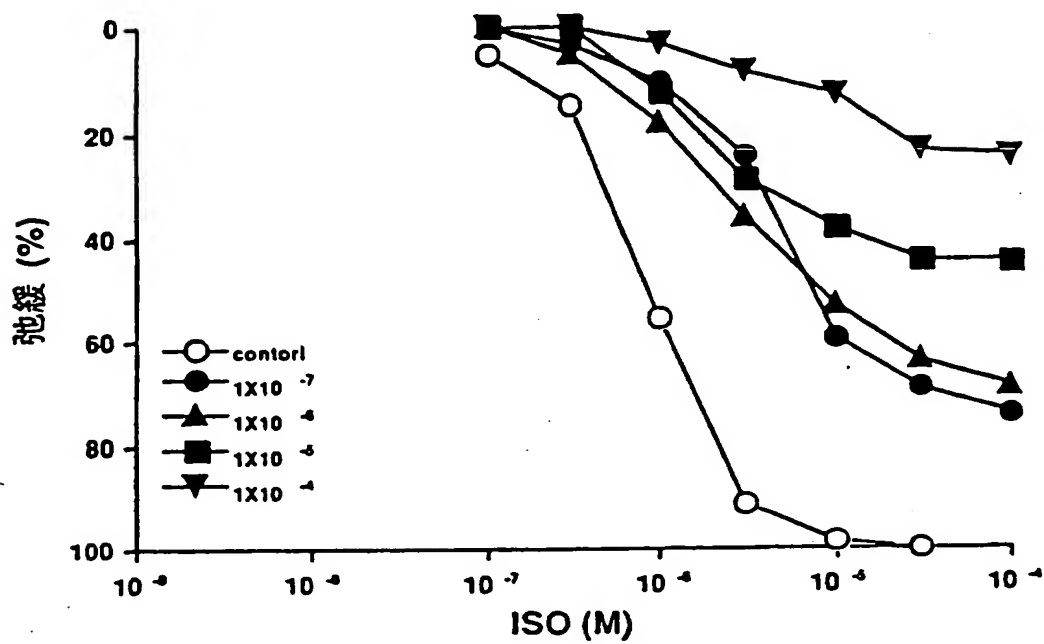


FIG. 16

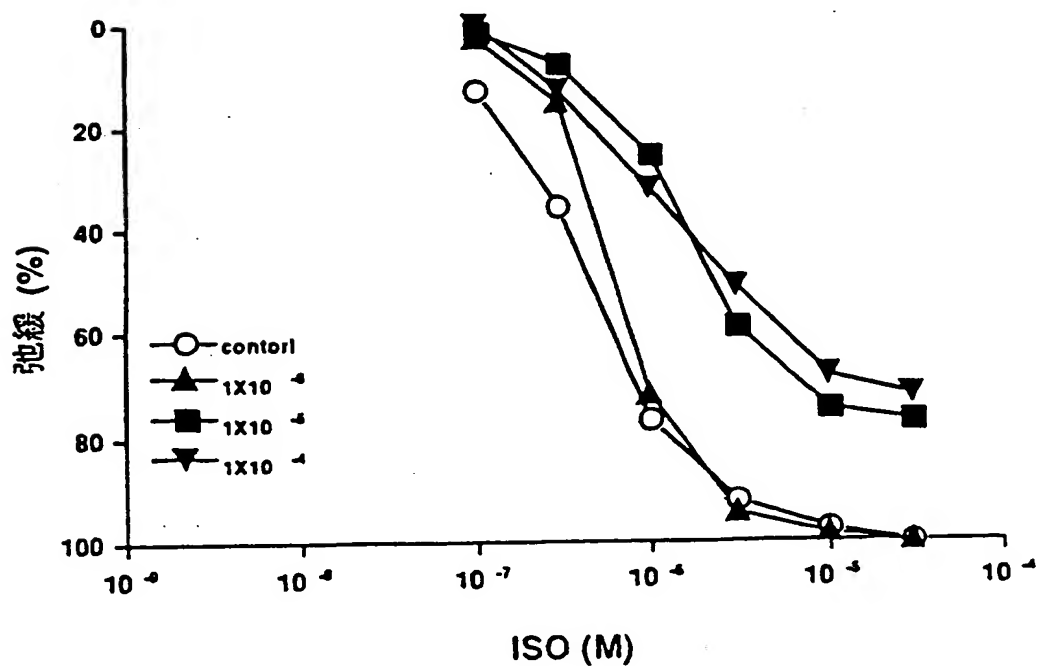


FIG. 17

15/15

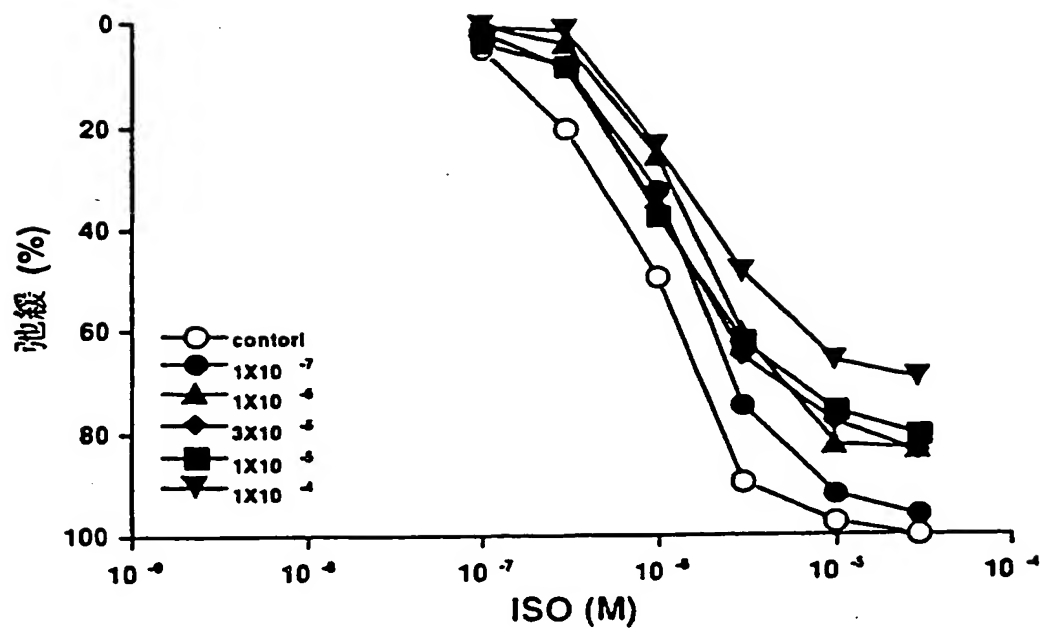


FIG. 18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/02697

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1⁶ C07K5/062, 14/705, 14/715, A61K38/03, 38/06, 38/17,
G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1⁶ C07K5/062, 14/705, 14/715, A61K38/03, 38/06, 38/17,
G01N33/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SATO, T. et al., FAP-1: A Protein Tyrosine Phosphatase That Associates with Fas., Science, April 1995, Vol. 268, p.411-p.415 (Particularly, p.412 Fig. 2. Amino acid sequence (h))	17-27, 30, 33-39
X		1-16, 28, 29, 31, 32, 40, 41
A	ITOH, N. et al., The Polypeptide Encoded by the cDNA for Human Cell Surface Antigen Fas Can Mediate Apoptosis., Cell, 1991, Vol. 66, p.233-p.243	1-32, 36, 37, 40, 41
A	ITOH, N. et al., A Novel Protein Domain Required for Apoptosis. Mutational Analysis of Human Fas Antigen., J. Biol. Chem., 1993, Vol. 268, No. 15, p.10932-p.10937	1-32, 36, 37, 40, 41
A	LABURTHER, M. and COUVINEAU, A., Molecular Analysis of Vasoactive Intestinal Peptide Receptors. A Comparison with Receptors for VIP-Related Peptides.,	1-30, 33, 36, 37, 40, 41

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
November 29, 1996 (29. 11. 96)

Date of mailing of the international search report
December 10, 1996 (10. 12. 96)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office
Facsimile N .

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/02697

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Ann. New York Acad. Sci., 1988, Vol. 527, p.296-p.313	
A	SREEDHARAN, S. P. et al., Structure, expression, and chromosomal localization of the type I human vasoactive intestinal peptide receptor gene., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, March 1995, Vol. 92, p.2939-p.2943	1-30, 33, 36, 37, 40, 41
A	SREEDHARAN, S. P. et al., Cloning and functional expression of a human neuroendocrine vasoactive intestinal peptide receptor., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1993, Vol. 193, p.546-p.553	1-30, 33, 36, 37, 40, 41
A	SVOBODA, M. et al., Molecular cloning and functional characterization of a human VIP receptor from SUP-T1 lymphoblasts., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1994, Vol. 205, p.1617-p.1624	1-30, 33, 36, 37, 40, 41
A	MUENCH, G. et al., Multisite contacts involved in coupling of the 8-adrenergic receptor with the stimulatory guanine-nucleotide-binding regulatory protein., Eur. J. Biochem., 1991, Vol. 198, p.357-p.364	1-30, 34, 36, 39-41
A	PALM, D. et al., Identification of a Gs-protein coupling domain to the 8-adrenoceptor using site-specific synthetic peptide., FEBS lett., 1990, Vol. 261, No. 2, p.294-p.298	1-30, 34, 36, 39-41
A	SCHOFIELD, P. R. et al., Primary structure of the human beta-adrenergic receptor gene., Nucleic Acids Res., 1987, Vol. 15, p. 3636	1-30, 34, 36, 39-41
PA	PRADO, G. N. et al., Role of the C Terminus of the Interleukin 8 Receptor in Signal Transduction and Internalization., J. Biol. Chem., August 1996, Vol. 271, No. 32, p.19186-p.19190	1-30, 35, 36, 38, 40, 41
PA	RICHARDSON, R. M. et al., Regulation of Human Interleukin-8 Receptor A: Identification of a Phosphorylation Site Involved in Modulating REceptor Function., Biochemistry, October 1995, Vol. 34, p.14193-p.14201	1-30, 35, 36, 38, 40, 41
A	HOLMES, W. E. et al., Structure and Functional Expression of a Human Interleukin-8 Receptor., Science, 1991, Vol. 253, p.1278-p.1280	1-30, 35, 36, 38, 40, 41
A	MURPHY, P. M. et al., Cloning of Complementary	1-30, 35,

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/02697

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 42, 43
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 42 and 43 pertain to methods for treatment of the human or animal body by therapy and thus relate to a subject matter which International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/02697

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	DNA Encoding a Functional Human Interleukin-8 Receptor., Science, 1991, Vol. 253, p.1280-p.1283	36, 38, 40, 41

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl¹ C 07 K 5/062, 14/705, 14/715,
A 61 K 38/03, 38/06, 38/17, G 01 N 33/68

B. 調査を行った分野
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl¹ C 07 K 5/062, 14/705, 14/715,
A 61 K 38/03, 38/06, 38/17, G 01 N 33/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	SATO, T. et al., FAP-1: A Protein Tyrosine Phosphatase That Associates with Fas.,	17-27, 30, 33-39
X	Science, April 1995, Vol. 268, p. 411-p. 415 (特に、p. 412 Fig. 2. Amino acid sequence (h))	1-16, 28, 29, 31, 32, 40, 41
A	ITO, N. et al., The Polypeptide Encoded by the cDNA for Human Cell Surface Antigen Fas Can Mediate Apoptosis.,	1-32, 36, 37, 40, 41
	Cell, 1991, Vol. 66, p. 233-p. 243	
A	ITO, N. et al., A Novel Protein Domain Required for Apoptosis. Mutational Analysis of Human Fas Antigen.,	1-32, 36, 37, 40, 41
	J. Biol. Chem., 1993, Vol. 268, No. 15, p. 10932-p. 10937	

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
29. 11. 96

国際調査報告の発送日
10.12.96

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
松岡 嘉彦 印
電話番号 03-3581-1101 内 3444

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	LABUTHE, M. and COUVINEAU, A. . Molecular Analysis of Vasoactive Intestinal Peptide Receptors. A Comparison with Receptors for VIP-Related Peptides., Ann. New York Acad. Sci., 1988, Vol.527, p.296-p.313	1-30, 33, 36, 37, 40, 41
A	SREEDHARAN, S. P. et al., Structure, expression, and chromosomal localization of the type I human vasoactive intestinal peptide receptor gene., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, March 1995, Vol. 92, p. 2939-p.2943	1-30, 33, 36, 37, 40, 41
A	SREEDHARAN, S. P. et al., Cloning and functional expression of a human neuroendocrine vasoactive intestinal peptide receptor., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1993, Vol.193, p. 546-p.553	1-30, 33, 36, 37, 40, 41
A	SVOBODA, M. et al., Molecular cloning and functional characterization of a human VIP receptor from SUP-T1 lymphoblasts., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1994, Vol.205, p. 1617-p.1624	1-30, 33, 36, 37, 40, 41
A	MUENCH, G., et al., Multisite contacts involved in coupling of the β -adrenergic receptor with the stimulatory guanine-nucleotide-binding regulatory protein., Eur. J. Biochem., 1991, Vol.198, p. 357-p.364	1-30, 34, 36, 39-41
A	PALM, D., et al., Identification of a Gs-protein coupling domain to the β -adrenoceptor using site-specific synthetic peptide., FEBS lett., 1990, Vol.261, No. 2, p. 294-p.298	1-30, 34, 36, 39-41
A	SCHOFIELD, P. R. et al., Primary structure of the human beta-adrenergic receptor gene., Nucleic Acids Res., 1987, Vol.15, p. 3636	1-30, 34, 36, 39-41
P A	PRADO, G. N. et al., Role of the C Terminus of the Interleukin 8 Receptor in Signal Transduction and Internalization., J. Biol. Chem., August 1996, Vol.271, No.32, p. 19186-p.19190	1-30, 35, 36, 38, 40, 41
P A	RICHARDSON, R. M. et al. Regulation of Human Interleukin-8 Receptor A: Identification of a Phosphorylation Site Involved in Modulating Receptor Function., Biochemistry, October 1995, Vol.34, p. 14193-p.14201	1-30, 35, 36, 38, 40, 41
A	HOLMES, W. E. et al. Structure and Functional Expression of a Human Interleukin-8 Receptor., Science, 1991, Vol.253, p. 1278-p.1280	1-30, 35, 36, 38, 40, 41
A	MURPHY, P. M. et al., Cloning of Complementary DNA Encoding a Functional Human Interleukin-8 Receptor., Science, 1991, Vol.253, p. 1280-p.1283	1-30, 35, 36, 38, 40, 41

第1稿 請求の範囲の一部の調査ができていないことを想定して、
法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

- 請求の範囲 は、治療による人体又は動物の体の処置方法に関するものであるから、PCT 17条(2)(a)(i)及びPCT規則 39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。

3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって P C T 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみにについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

THIS PAGE BLANK (USPTO)